

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Derivados de tomate y aceite de oliva virgen extra:  
calidad, compuestos bioactivos y alegaciones de salud**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Delia Fernández Redondo**

Directoras

Montaña Cámara Hurtado  
Virginia Fernández Ruiz

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA



**DERIVADOS DE TOMATE Y ACEITE DE OLIVA  
VIRGEN EXTRA. CALIDAD, COMPUESTOS  
BIOACTIVOS Y ALEGACIONES DE SALUD**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR:

**DELIA FERNÁNDEZ REDONDO**

Bajo la dirección de las doctoras:  
Montaña Cámara Hurtado  
Virginia Fernández Ruiz

Madrid, 2015





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

-----  
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II  
Bromatología

**M<sup>a</sup> DOLORES TENORIO SANZ, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICA QUE:**

El presente trabajo de investigación titulado **“DERIVADOS DE TOMATE Y ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA. CALIDAD, COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ALEGACIONES DE SALUD”** se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las doctoras Montaña Cámara Hurtado y Virginia Fernández Ruiz, y constituye la Memoria que presenta la licenciada Dña. Delia Fernández Redondo para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a trece de febrero de dos mil quince.







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

-----  
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II  
Bromatología

**MONTAÑA CÁMARA HURTADO, PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, Y VIRGINIA FERNÁNDEZ RUIZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR, EN EL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICAN QUE:**

Dña. Delia Fernández Redondo, ha realizado bajo su dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título **“DERIVADOS DE TOMATE Y ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA. CALIDAD, COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ALEGACIONES DE SALUD”** y que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a trece de febrero de dos mil quince.



## **AGRADECIMIENTOS**

Éstas son sin duda las palabras menos científicas escritas en este trabajo, la parte de la Tesis que no se puede escribir con palabras técnicas ni razonamientos lógicos basados en resultados. Estas palabras tienen que expresar sentimientos, en concreto sentimientos de gratitud y cariño, aunque después de tantas horas trabajando con artículos, libros, métodos analíticos y datos, es quizás la parte más difícil.

Intentaré empezar por el principio y agradecer a mis directoras de Tesis, Montaña Cámara y Virginia Fernández haber podido llegar hasta aquí después de unos años que no han sido nada fáciles. Cuando yo creía que no iba a poder continuar con este trabajo al no disponer de una beca de Doctorado y a pesar de haber realizado ya una parte importante, había decidido que me sería imposible finalizarlo, y comencé a plantearme otras alternativas. Sin embargo, ellas me animaron a continuar en los momentos en los que me fuera posible compatibilizándolo con el estudio o el trabajo y me hicieron ver que era capaz.

A Montaña la conozco desde que entré en la Universidad hace ya algo más de diez años, y desde el primer momento me ha animado a colaborar con los diferentes proyectos del departamento, congresos, el Máster y finalmente el Doctorado. Recuerdo cuando Vicky me habló sobre la beca de intercambio con la Universidad de Davis, California, aventura a la que me embarqué y que me hizo crecer, madurar y aprender, y que sin el apoyo y los esfuerzos de Montaña y Vicky hubiera sido imposible.

Allí, en Estados Unidos, conocí gente increíble y entre ellos quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio de Food Science como Irene Zhao, Hanjiang Zhu, Yi Zhou, Shuaikun Tang, Angelina Sansone, Theresa Leung, entre otros, y compañeros y amigos de clase porque siempre me sentí arropada e integrada en una sociedad muy diferente de la que conozco, y que sin su ayuda me habría resultado duro adaptarme, y, por supuesto aprender y poder trabajar adecuadamente y con motivación en el departamento. Por supuesto, doy gracias a mi tutor, el Dr. Charles Shoemaker porque siempre ha estado dispuesto a ayudarme y sin él no habría sido posible mi estancia allí. También a la Dra. Selina Wang, que ejerció como mi tutora varias veces y cuya ayuda ha sido esencial en la consecución de mis objetivos en Davis. Entre mis compañeros quiero

mencionar más concretamente a Aaron porque vi en él un gran apoyo y gran amigo que a día de hoy, aun separándonos kilómetros de distancia, nos sigue uniendo una gran amistad, e incluso me ha ayudado con gran esmero a escribir correctamente los apartados en inglés y me ha ofrecido su ayuda en todo momento.

Quiero expresar mi gratitud a mis compañeros de laboratorio de Madrid y ahora doctores, con los que he compartido buenos momentos en la facultad, Patricia, Brigi, Esther, Raquel... Gracias a la Dra. M<sup>a</sup> Cortes Sánchez, con la que he pasado mucho tiempo, por su simpatía, su ayuda y sus consejos.

Mis padres ocupan un lugar especial en mi vida, les agradezco que siempre hayan sido exigentes conmigo porque sabían que yo era capaz de conseguir lo que me propusiera. Les doy gracias por sus ánimos en los momentos difíciles, por su cariño, por confiar en mí, y porque desde luego, si hoy soy quien soy, es en gran parte por ellos, y por ellos soy autoexigente, trabajadora, ambiciosa y con ganas de superarme, lograr nuevas metas y no abandonar cuando el camino es difícil. Gracias a mi hermana Lucía, claro ejemplo de trabajo duro, ambición, constancia y éxito en lo que hace y se propone. Dos años menor que yo pero un referente en mi vida, a la que además quiero un montón.

Una de las personas que más me ha acompañado en este gran viaje ha sido mi mejor amigo Antonio. Desde que empecé con este proyecto en mi último año de carrera hasta el mismo momento de estar escribiendo estos agradecimientos y pasando por mi estancia en Estados Unidos, ha sabido hacerme sentir con fuerzas y ganas cuando yo veía difícil acabar con éxito esta etapa, tanto en lo referente a la Tesis como en otros aspectos de mi vida. Él ha conseguido hacer que confíe en mí.

Son sin duda las buenas personas de las que uno se rodea las que hacen que las cosas sean fáciles, que se puedan llevar con ánimo, ganas y alegría. Estos párrafos sirven para dejar escrito en mi memoria lo agradecida que estoy a estas personas tan importantes en mi vida, pero espero de verdad habérselo demostrado día a día.

Muchas gracias.

*A mis padres, mi hermana Lucía y Antonio. Las personas más importantes de mi vida.*

*Con todo el cariño que puedo darles y que se merecen.*



<b>1. PARTE GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1. DIETA MEDITERRÁNEA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS	3
1.2. ALEGACIONES DE SALUD EN EL ETIQUETADO	13
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVOS	19
2.2. PLAN DE TRABAJO	21
<b>3. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE LICOPENO EN DERIVADOS DE TOMATE</b>	<b>23</b>
3.1. IMPORTANCIA DEL TOMATE Y SUS DERIVADOS	25
3.1.1. Tipos de derivados de tomate	32
3.1.2. Tomate y salud	37
3.2. OBJETIVOS	49
3.3. MATERIALES	51
3.4. METODOLOGÍA	55
3.4.1. Determinación del contenido de licopeno	55
3.4.2. Estudio estadístico	62
3.5. RESULTADOS	65
3.5.1. Caracterización del contenido inicial de licopeno	65
3.5.2. Estudio de la estabilidad del licopeno	67
3.5.3. Aplicación de modelos matemáticos para la predicción del contenido de licopeno en derivados de tomate	79
3.5.4. Estudio de las alegaciones de salud del tomate y licopeno	85
3.6. CONCLUSIONES PARCIALES	91
<b>4. ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA</b>	<b>93</b>
4.1. IMPORTANCIA DEL ACEITE DE OLIVA	95
4.1.1. Tipos de aceites de oliva	102
4.1.2. Aceite de oliva y salud	110
4.2. OBJETIVOS	125
4.3. MATERIALES	127
4.4. METODOLOGÍA	135
4.4.1. Determinación de parámetros de calidad comercial	135



4.4.2. Otros parámetros de calidad: diacilglicéridos y polifenoles totales	138
4.4.3. Estudio estadístico	151
4.5. RESULTADOS	153
4.5.1. Parámetros químicos de calidad comercial y calidad diferenciada	154
4.5.2. Otros parámetros de calidad: diacilglicéridos y polifenoles totales	172
4.5.3. Análisis de Componentes Principales	191
4.5.4. Estudio de las alegaciones de salud del aceite de oliva y los polifenoles	195
4.6. CONCLUSIONES PARCIALES	203
<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b>	205
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	215
6.1. BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA	217
6.2. NORMATIVA	243
<b>7. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL</b>	247
<b>8. RESUMEN Y ABSTRACT</b>	251
8.1. RESUMEN	253
8.2. ABSTRACT	259



## 1. PARTE GENERAL

---



## 1.1. DIETA MEDITERRÁNEA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS

La Dieta Mediterránea, cuyo nombre proviene de la palabra griega “*diaita*” (modo de vida) se refiere a un conjunto de competencias, conocimientos, prácticas y tradiciones relacionadas con la alimentación humana, que se ha ido transmitiendo de generación en generación y que abarca los cultivos, las cosechas y la pesca, así como la conservación, transformación y preparación de los alimentos y, en particular, su consumo.

Los ingredientes principales que caracterizan la Dieta Mediterránea son el aceite de oliva, los cereales, las frutas y verduras, una proporción moderada de carne, pescado y productos lácteos, condimentos y especias. Con estas consideraciones, la Dieta Mediterránea ha sido inscrita en la Lista Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad, decisión que fue tomada en la octava reunión del Comité Intergubernamental celebrada en Baku, Azerbaiyán del 2 al 7 de diciembre de 2013 (Unesco, 2013). La Dieta Mediterránea es por tanto un elemento cultural relacionado con la alimentación que propicia la interacción social.

Si bien los pueblos griego y romano fueron los responsables del establecimiento de los fundamentos de esta dieta, existen influencias de otras regiones y culturas, derivadas de los diversos procesos de colonización y expansión que han ido sufriendo los pueblos del Mediterráneo. Así, la carne fue introducida por la relación entre el Imperio Romano y el pueblo germano; los tubérculos, las legumbres, el arroz y diversas verduras fueron introducidas por influencia del mundo árabe y los pueblos del Nuevo Mundo (Pérez-Rodrigo y Aranceta-Bartrina, 2011).

Los beneficios de la Dieta Mediterránea se empezaron a investigar a partir de los años 50 cuando se observó que la mortalidad por enfermedad cardiovascular era menor en las áreas rurales del sur de Italia y Creta, a pesar de poseer menores ingresos y una prestación sanitaria más precaria, que en el norte de Europa o en Estados Unidos. Durante la II Guerra Mundial, en la Universidad de Minnesota, Ancel Keys realizó un estudio sobre las dietas y los hábitos de consumo en poblaciones de Italia, Yugoslavia, Grecia, Países Bajos, Finlandia, Estados Unidos y Japón, conocido como el Estudio de los

Siete Países (Keys *et al.*, 1986). Los resultados mostraron que la dieta de las zonas rurales del Mediterráneo en los años 50 y comienzos de los 60 estaba formada por una elevada proporción de calorías procedentes de carbohidratos, mayoritariamente de pan y pasta, una ingesta baja de carne y productos lácteos, un consumo elevado de frutas y verduras, algo de pescado, un consumo regular aunque modesto de vino y muy poco azúcar. La clave se encontraba en la naturaleza de las grasas, ya que, aunque se consumían en más o menos la misma proporción en el sur y en el norte de Europa, en el norte provenían principalmente de carne y productos lácteos, que contienen una elevada cantidad de ácidos grasos saturados, lo que podría ser la causa de los accidentes cardiovasculares. Por el contrario, la mayoría de las grasas y aceites en la región mediterránea se obtenía de aceites vegetales, en particular, del aceite de oliva. Durante esos años, en las zonas rurales mediterráneas el aceite de oliva suponía entre un 15 y un 33% del total de las calorías diarias (Trichopoulou *et al.*, 1993).

A partir de este momento, la comunidad científica ha ido demostrando los beneficios de la Dieta Mediterránea para la salud así como su efecto protector contra enfermedades crónicas (Scoditti, E. *et al.*, 2012). Numerosos estudios epidemiológicos (Sofi *et al.*, 2008) llevados a cabo recientemente en varios países han confirmado que un buen cumplimiento de esta dieta tradicional está sistemáticamente asociado a una disminución del riesgo de episodios cardiovasculares y mortalidad (Trichopoulou *et al.*, 1995, 2003, 2005 y 2009; Martínez-González *et al.*, 2002; Estruch *et al.*, 2006; Buckland *et al.*, 2009; Martínez-González *et al.*, 2009), a una reducción en el peso corporal (Méndez *et al.*, 2006; Panagiotakos *et al.*, 2006; Sánchez-Villegas *et al.*, 2006; Buckland *et al.*, 2008; Zazpe *et al.*, 2011), a un menor contorno de cintura, siendo este criterio un marcador de obesidad central (Panagiotakos *et al.*, 2006; Romaguera *et al.*, 2009; Issa *et al.*, 2011), así como a una menor incidencia de síndrome metabólico (Esposito *et al.*, 2004, Tortosa *et al.*, 2007; Babio *et al.*, 2009; Rumawas *et al.*, 2009; Kastorini *et al.*, 2011) y de diabetes tipo 2 (Martínez-González *et al.*, 2008). Además, existen estudios de casos y controles (La Vecchia, 2004) y otras revisiones (Sofi *et al.*, 2008; Bosetti *et al.*, 2009; Verberne *et al.*, 2010) que indican que una ingesta elevada de alimentos típicos de la Dieta Mediterránea tradicional se asocia a una reducción en el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer.

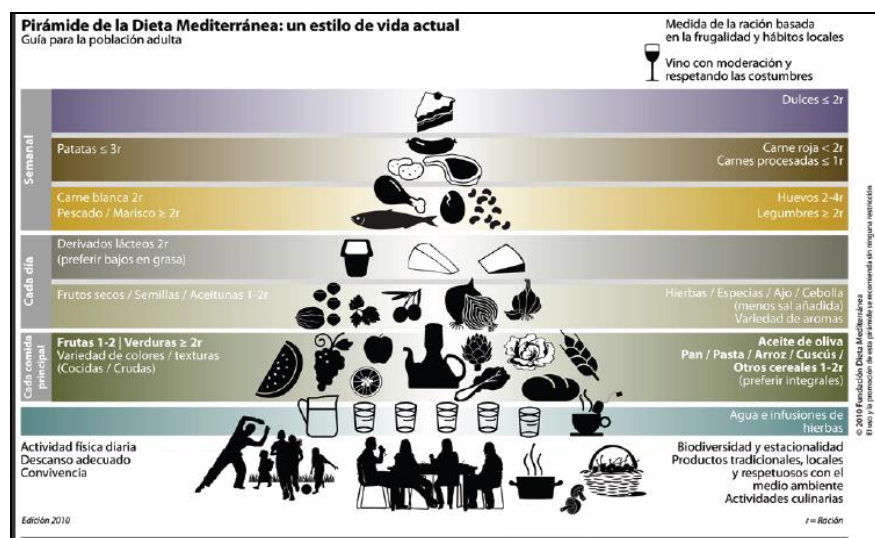
Aunque menos estudiado hasta ahora, se ha observado que el riesgo de contraer la enfermedad de Parkinson o Alzheimer es menor en personas que siguen un modelo tradicional de Dieta Mediterránea (Sofi *et al.*, 2008). Parece ser que esta dieta podría tener una influencia beneficiosa en el proceso de envejecimiento al reducir la evolución del declive cognitivo relacionado con el Alzheimer y la demencia de origen vascular (Féart *et al.*, 2010; Tyrovolas y Panagiotakos, 2010).

Si bien la dieta de los países mediterráneos, se caracterizaba por ser una dieta rica en grasa monoinsaturada, con consumo moderado de alcohol, elevado consumo de legumbres, cereales y patatas, frutas, verduras, hortalizas y pescado, y con un bajo consumo de carnes y lácteos, en los últimos 40 años ha evolucionado hacia patrones más occidentalizados reduciéndose considerablemente el consumo de algunos alimentos característicos como los cereales, el pan, las patatas, legumbres y el aceite de oliva, y aumentando significativamente el consumo de grasas, lácteos y carnes, especialmente de aves, con lo que la dieta ha dejado de ser predominantemente vegetariana. Desde un punto de vista nutricional, la dieta se ha enriquecido en grasa saturada, colesterol, sal y azúcares, en detrimento de hidratos de carbono complejos y fibra vegetal (Alonso-Aperte, 2011). Estos cambios en el comportamiento alimentario, asociados además a una actividad física baja, se han relacionado con un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas.

Para ayudar a la población a seleccionar aquellos alimentos más adecuados según este patrón dietético, el modelo de Dieta Mediterránea saludable se ha representado mediante una pirámide que muestra gráficamente los alimentos que debemos consumir a diario (localizados en la base de la pirámide), semanalmente, o con menos frecuencia (los situados en el vértice). La primera pirámide de la Dieta Mediterránea tradicional se presentó en 1993, en la Conferencia Internacional sobre Dietas Mediterráneas celebrada en la Escuela de Salud Pública en Boston. Posteriormente, en 1994, Oldways Preservation & Exchange Trust la registraron bajo copyright (Willett *et al.*, 1995). Desde entonces, se han diseñado varias pirámides de Dieta Mediterránea representando los hábitos de las

poblaciones de Grecia (Supreme Scientific Health Council, 1999), España (Aranceta y Serra-Majem, 2001), e Italia (Ministero della Salute-Gruppo di lavoro, 2004).

En 2009, la Fundación Dieta Mediterránea y el Foro sobre Culturas Alimentarias Mediterráneas dialogaron para lograr un consenso entre la comunidad científica internacional relacionada con la Dieta Mediterránea en torno a una nueva pirámide revisada y actualizada, así como sobre la Dieta Mediterránea como modelo de dieta sostenible. Dicho consenso se alcanzó en noviembre de 2009, en la III Conferencia Internacional CIISCAM (Centro Interuniversitario Internazionale di Studi sulle Culture Alimentari Mediterranee) celebrada en Parma, Italia sobre la "Dieta Mediterránea actual, un modelo de alimentación sostenible" (CIISCAM, 2009). En 2010, en Barcelona, durante el VIII Congreso Internacional sobre la Dieta Mediterránea, se volvió a revisar la pirámide de 2009, se rediseñó y se complementó con un texto informativo redactado por el Comité Científico Internacional de la Fundación Dieta Mediterránea (Bach-Faig *et al.*, 2011). La nueva pirámide, publicada en 2013 (figura 1.1), tenía como fin adaptarse a los diversos contextos geográficos, socioeconómicos y culturales del estilo de vida mediterráneo actual de los diferentes países. Las recomendaciones de la pirámide se basan en las últimas evidencias científicas en el campo de la nutrición y la salud, la sostenibilidad de los patrones alimentarios y el reconocido papel de esta dieta en la prevención de diversas enfermedades crónicas a partir de numerosos estudios epidemiológicos.



**Figura 1.1 Pirámide de la Dieta Mediterránea (Fundación Dieta Mediterránea, 2013).**

Para lograr una dieta saludable y equilibrada, la pirámide establece pautas alimentarias de cumplimiento diario, semanal y ocasional. Según este patrón, en las comidas principales no deben faltar los tres elementos básicos que se sitúan en la base de la pirámide: los cereales, de los cuales se deben consumir una o dos raciones por comida, las verduras, que deben estar presentes tanto en la comida como en la cena, aproximadamente dos raciones en cada toma, y las frutas de las que se recomienda consumir una o dos piezas por comida. Los productos lácteos preferiblemente deben consumirse en forma de yogur y queso bajos en grasa, y su consumo debe ser moderado (en torno a dos raciones diarias). Además, es fundamental garantizar el aporte diario de entre 1,5 y 2 litros de agua.

También se incluyen especias, hierbas, cebollas, ajos, aceitunas, frutos secos y semillas, además de un consumo moderado de vino u otras bebidas fermentadas.

Se recomienda consumir semanalmente proteínas tanto de origen animal como de origen vegetal. El pescado (dos o más raciones), la carne magra (dos raciones) y el huevo (2-4 raciones) son fuentes de proteína de alta calidad de origen animal. El consumo de carne roja (menos de dos raciones y preferentemente cortes magros) y de carne procesada (menos de una ración) debe ser reducido tanto en cantidad como en frecuencia. En el



vértice de la pirámide encontramos los dulces que deben estar presentes en la dieta en pequeñas cantidades y sólo de forma ocasional.

Esta nueva pirámide también incluye otras recomendaciones como la moderación en las comidas, dedicar tiempo en la preparación de los alimentos, realizar las comidas en compañía y consumir los alimentos de temporada y frescos ya que contienen más nutrientes y sustancias beneficiosas. Considera de gran importancia la práctica regular de actividad física moderada además de un descanso adecuado.

La Dieta Mediterránea es, por tanto, un buen ejemplo de dieta prudente y saludable, que además de ser sana, nutritiva y palatable, juega un papel esencial en la prevención de ciertas enfermedades crónicas, por lo que esta dieta única se ha convertido en el estándar de una vida más duradera y de buena salud. Dentro de la Dieta Mediterránea, el tomate es la hortaliza más representativa y el aceite de oliva la grasa más recomendable, y por ello han sido seleccionados como objeto de estudio en esta memoria.

En cuanto a los beneficios de los alimentos más característicos de la Dieta Mediterránea, diversos estudios científicos, como SUVIMAX (Suppléments en Vitamines, Minéraux et Antioxydants), y el EPIC (Estudio Prospectivo sobre la Investigación del Cáncer y la Nutrición), confirman que el consumo de frutas y vegetales, debido a su contenido en componentes antioxidantes, es una de las opciones más efectivas y seguras en la prevención de enfermedad cardiovascular y otras enfermedades degenerativas (Hercberg *et al.*, 2006; Agudo y González, 2007), teniendo siempre en cuenta que la relación entre dieta y salud debe ser considerada de forma global, incluyendo variedad de alimentos, formas de preparación y hábitos alimentarios (Suter, 2000; Olmedilla *et al.*, 2001; Halliwell, 2007).

Es necesario resaltar que los efectos beneficiosos que se manifiestan por el consumo de una dieta rica en frutas y hortalizas no pueden atribuirse a un solo compuesto o mezcla de compuestos, sino al efecto sinérgico de todos ellos. Así, se ha observado que la ingesta de los compuestos por separado en forma de complementos alimenticios no

origina los mismos efectos que los producidos por el consumo de frutas y hortalizas (Cervera Ral, 2008).

La calidad nutritiva de los productos vegetales depende de la cantidad y calidad de los macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) y micronutrientes (vitaminas, elementos minerales, ácidos grasos y aminoácidos esenciales), además de proporcionar compuestos “bioactivos” (compuestos de origen vegetal con acción beneficiosa para la salud) que pueden tener un mecanismo de acción complementario y/o superpuesto (Cámara, 2006a). Entre dichos mecanismos se incluyen la modulación de enzimas detoxificantes, estimulación del sistema inmune, reducción de la agregación plaquetaria, modulación de la síntesis de colesterol y del metabolismo hormonal, reducción de la presión sanguínea, y efectos antioxidantes, antibacterianos y antivirales (FECYT, 2005).

Los compuestos bioactivos pueden tener propiedades, estructuras y funciones muy variadas (Halliwell, 1987; Lampe, 1999; Cámara *et al.* 2003b). Entre los distintos compuestos bioactivos presentes en los alimentos de origen vegetal, que contribuyen a la prevención de enfermedades y a la mejora de la calidad de vida de la población, se incluyen entre otros:

**Carotenoides** como el licopeno (abundante en tomates, sandías y variedades rosas de pomelos), que posee actividad antioxidante y está implicado en la disminución del riesgo de padecer distintos tipos de cáncer y enfermedad cardiovascular; o la luteína (presente en verduras y algunos frutos), implicada en la prevención de aparición de cataratas y otros procesos degenerativos oculares entre otros (Rao, 2006).

**Esteroides** como los fitoesteroles (campesterol, sitosterol, estigmasterol) y fitoestanoles con efectos demostrados en la inhibición de la absorción intestinal de colesterol.

**Tocoferoles y tocotrienoles** (en sus formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), con acción antioxidante, mediante la inhibición de la peroxidación lipídica a nivel de la fase de propagación.

**Compuestos fenólicos**, procedentes del metabolismo secundario de las plantas (Manach *et al.*, 2004; Cheynier, 2012) con una gran diversidad estructural. Se caracterizan por

poseer anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Engloba a flavonoides (flavonoles, falconas, flavanoles, flavanonas, isoflavonoides y antocianos), ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, etc. En esta fracción se incluyen también isoflavonas como la daidzeína, genisteína o coumestrol, con acciones fitoestrogénicas, y presentes en soja, ciruelas, higos, fresas, melón o peras.

**Compuestos azufrados:** glucosinolatos, isotiocianatos e indoles (presentes en Crucíferas); alicina y alil-sulfidos (abundantes en los bulbos de Liliaceas).

Como se ha mencionado, muchos de estos compuestos bioactivos (carotenoides, tocoferoles, compuestos fenólicos, y compuestos azufrados), poseen capacidad antioxidante, siendo por tanto capaces de contrarrestar el estrés oxidativo provocado por el ataque de moléculas altamente oxidantes, como los radicales libres, a los diferentes tejidos y biomoléculas del organismo (material genético, lipoproteínas plasmáticas y de membrana), causante de procesos de envejecimiento celular, y la aparición de enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas o desórdenes neurológicos, entre otros.

Los radicales libres se producen como consecuencia de la actividad aeróbica de las células, son muy reactivos y pueden dañar un gran número de moléculas biológicas. Entre el 1 y el 3% del oxígeno que consumen las células del cuerpo son transformadas en ROS (especies reactivas de oxígeno), que son potencialmente dañinas, o intervienen en la formación de éstas. Una importante función de los antioxidantes es interceptar los estados triplete, para prevenir la formación del oxígeno singlete, o atraparlo directamente. También son reactivos frente a otras especies de oxígeno como el radical hidroxilo y el anión superóxido. En el organismo existen mecanismos de defensa contra la oxidación como las enzimas glutatión peroxidada y reductasa, la catalasa o la superóxido dismutasa.

Cuando el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes se pierde en favor de los primeros, se desencadenan procesos nocivos que se asocian al desarrollo de numerosas enfermedades como alteración cardiovascular, iniciación de procesos cancerosos,

formación de cataratas, procesos de envejecimiento, procesos inflamatorios y alteraciones neurológicas. Una de las enfermedades más comunes relacionadas con el aparato cardiovascular es la aterosclerosis, que se caracteriza principalmente por la progresiva obstrucción de las arterias como consecuencia de la acumulación de lípidos en la pared arterial. Estos lípidos atraviesan el endotelio, acumulándose y oxidándose en las células endoteliales, en las células de la musculatura lisa vascular y en los macrófagos. Se ha descrito que las LDL oxidadas y también sus productos de degradación, pueden estar implicados en la aterosclerosis tanto en la iniciación como en la progresión de la enfermedad. Además, otros procesos relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis como la inflamación, la proliferación celular y la trombosis pueden tener también su origen en la oxidación o estar inducidos por lipoproteínas oxidadas (Berliner y Heinecke, 1996). Zhang *et al.* (2011) apoyan la recomendación de aumentar el consumo de frutas y verduras para promover la salud cardiovascular y la longevidad general. La Organización Mundial de la Salud en colaboración con la “World Heart Federation” y la “World Stroke Organization” han constatado que la ingesta diaria elevada de grasas saturadas, grasas trans, colesterol y sal, y el bajo consumo de frutas, verduras y pescado aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, y que aproximadamente 1,7 millones de muertes en el mundo (2,8%) están atribuidas a un bajo consumo de frutas y verduras (Mendis *et al.*, 2011).

El daño oxidativo del ADN está considerado como un factor causante de diversos tipos de cáncer, por lo que las frutas y hortalizas, debido a su alto contenido en antioxidantes, pueden ser consideradas como importantes agentes quimiopreventivos (Clark *et al.*, 1996; Laso *et al.*, 2002).

Los compuestos antioxidantes previenen los efectos negativos de los radicales libres sobre tejidos y grasas, disminuyendo el riesgo de cáncer y alteraciones cardíacas al evitar la oxidación y citotoxicidad *in vitro* de moléculas como las LDL, disminuyendo por tanto la aterogenicidad (Seelert, 1992; Kong *et al.*, 2010). Además, la presencia de flavonas, ditioles, tioéteres, isotiocianatos, compuestos fenólicos y carotenoides, como el licopeno, suprimen la actividad metabólica de las sustancias cancerígenas, y por esta vía

pueden reducir el riesgo de cáncer. Estos componentes beneficiosos los podemos encontrar en: crucíferas (brócoli, coles de bruselas, coliflor, repollo), zanahorias, vegetales de hoja verde y tomates entre otros (Williamson, 1996; Lampe, 1999; Laso *et al.* 2002).

Se ha comprobado que la práctica regular del ejercicio físico, la eliminación del consumo de tabaco, la disminución en el consumo de alcohol y la adopción de una dieta adecuada serían suficientes para prevenir del 40 al 70% de las muertes prematuras, un tercio de todos los casos de incapacidades agudas y dos tercios de todas las crónicas (Mayor, 2010). Se ha visto que sólo un 5-10% de los casos de cáncer son debidos a factores genéticos y el 90-95% a factores ambientales y el estilo de vida. Todo esto permite poner en marcha medidas para su prevención (Anand *et al.*, 2008).

Debido a su bajo valor calórico y su riqueza en micronutrientes y compuestos bioactivos, las hortalizas, las verduras y las frutas son alimentos de gran importancia diaria en la dieta. Una de las hortalizas más representativa de este grupo en España es el tomate, tanto fresco como sus distintos derivados (salsas de tomate y el gazpacho entre otros). El aceite de oliva, situado en el centro de la pirámide, debe ser la principal fuente de grasa por su calidad nutricional. Se debe utilizar para aderezar y cocinar ya que su composición le confiere una alta resistencia a las elevadas temperaturas que se pueden alcanzar al cocinar los alimentos.

## 1.2. ALEGACIONES DE SALUD EN EL ETIQUETADO

En un futuro próximo no sólo se necesitarán alimentos para satisfacer las necesidades del aumento de población sino que estos alimentos deberán ser más nutritivos y servir para paliar las deficiencias nutricionales siendo éste uno de los objetivos de la Organización Mundial para la Salud (OMS) quien define la salud como “un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades” (OMS, 1990).

Según el ILSI (1999), un Alimento Funcional es “aquél que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, con un efecto fisiológico añadido por encima de su valor nutricional y cuyas acciones positivas justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional (fisiológico) o incluso saludable”.

En Europa, un alimento funcional tiene que cumplir las siguientes características: debe ser un alimento que pueda ser consumido habitual o diariamente como parte de la dieta normal; estar constituido por ingredientes naturales, en algunos casos en concentración superior a la del alimento original y puede contener algún ingrediente ausente en el alimento original; los efectos beneficiosos tienen que haberse demostrado científicamente y deben ir más allá de los derivados de su valor nutritivo; deben mejorar el estado del individuo, mejorar la calidad de vida o disminuir el riesgo de sufrir alguna patología. La presencia de estos compuestos bioactivos en cantidades significativas en los alimentos es lo que justifica su calificación como “alimentos funcionales” si bien esta no es una calificación oficial dado que no hay ninguna normativa que la respalde.

La Unión Europea estableció el 19 de enero de 2006 el Reglamento europeo de alegaciones nutricionales y de salud en el etiquetado (Reglamento (CE) 1924/2006) en el que se prohíbe que un alimento pueda promocionarse como poseedor de propiedades terapéuticas o curativas, y establece las siguientes categorías de declaraciones: “declaraciones nutricionales” o “de contenido”, “declaraciones de propiedades saludables” y “declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad”. Las declaraciones

de propiedades saludables son expresiones que describen una relación entre una sustancia alimenticia y una enfermedad u otra condición relacionada con la salud (es decir, una relación de “reducción de riesgo”). Se define como cualquier mensaje o representación comercial voluntaria en cualquier forma tal como texto, declaración, imagen, logotipo, etc, que afirme, sugiera o implique que existe una relación entre el alimento objeto de la alegación y la salud y el tipo de alegación sujeta a evaluación.

La exigencia del citado Reglamento es que cualquier declaración se base en evidencias científicas contrastadas y reales, y se aplica a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables efectuadas en las comunicaciones comerciales, ya sea en el etiquetado, la presentación o la publicidad de los alimentos que se suministren como tales al consumidor final. En esencia, el Reglamento vela por la protección del derecho de los consumidores a una información veraz, contrastada y con un riguroso fundamento científico, aspecto particularmente relevante en el caso de los alimentos.

Las declaraciones que hacen referencia a la salud son las siguientes:

- Declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad (artículo 14). Son las que implican o sugieren que el consumo de un alimento reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana cuya relación con la ingesta alimentaria ha sido debidamente documentada.
- Declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. (artículo 13). Describen funciones en el organismo y no hacen referencia a enfermedades o estados patológicos.
- Declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad y declaraciones relativas al desarrollo y la salud de los niños. (artículo 14).

Las condiciones generales que debe cumplir una alegación de este tipo es que se demuestre su efecto beneficioso mediante pruebas científicas, que el nutriente o la sustancia se encuentre en el producto final en cantidad significativa para producir el efecto declarado, que sea biodisponible, y que la cantidad de producto que cabría

consumir de forma razonable en una dieta equilibrada aporte una cantidad significativa del nutriente o sustancia declarada. Además, estas declaraciones deben ser comprensibles para el consumidor medio y harán referencia a alimentos listos para el consumo.

El trámite de las solicitudes se realiza a través de la EFSA (European Food Safety Authority) y en concreto, la evaluación científica es responsabilidad del Panel NDA (Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) englobado dentro de la unidad de Nutrición.

En la evaluación de las propuestas presentadas para la aceptación de alegaciones de salud, el Panel NDA tiene en consideración que el alimento o producto en cuestión esté bien definido y caracterizado, que el efecto alegado sea claro, definido y que ejerza un efecto fisiológico beneficioso en términos de salud humana. Requiere que la relación causa-efecto entre el consumo del alimento o constituyente y el efecto alegado quede bien establecida (para el grupo o población diana y en las condiciones de uso propuestas). Por otra parte, la redacción de la alegación propuesta tiene que reflejar claramente lo científicamente demostrado, cumplir los criterios establecidos en el Reglamento y que las cantidades recomendadas del producto o alimento requerido para obtener el efecto alegado puedan ser consumidas dentro de una dieta equilibrada. Las alegaciones se refieren a personas sanas, y por tanto, los efectos que cabe esperar son mucho más limitados que en supuestos de enfermedad, pues se trata de “mejorar la salud de personas consideradas sanas”.

Las declaraciones de propiedades saludables presentadas que han sido aceptadas figuran en el anexo del Reglamento 432/2012 en la lista de declaraciones de propiedades saludables que pueden atribuirse a los alimentos (distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños) y sus modificaciones posteriores en el Reglamento 1018/2013.







## 2. OBJETIVOS GENERALES Y PLAN DE TRABAJO

---



## 2.1. OBJETIVOS

Dada la importancia del tomate y del aceite de oliva virgen en la dieta mediterránea, no sólo por su composición nutricional, sino por los beneficios que ambos productos aportan sobre la salud humana, y debido también a su repercusión económica en nuestro país, en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluación del contenido de licopeno en derivados de tomate y evaluación de los compuestos bioactivos y parámetros de calidad en el aceite de oliva virgen extra.
2. Revisión de la situación actual de las alegaciones de salud en el etiquetado conforme al Reglamento 1924/2006 relativas al tomate, licopeno, polifenoles y aceite de oliva.

Para dar cumplimiento a estos objetivos generales se han realizado dos estudios independientes: el primero de ellos referente al análisis del contenido de licopeno en distintos derivados de tomate y su estabilidad a lo largo del tiempo, y un segundo estudio en el que se determinaron los parámetros de calidad comercial y calidad diferenciada, además del análisis de diacilglicéridos y polifenoles en diferentes muestras de aceite de oliva virgen extra.

Los objetivos específicos del estudio sobre el licopeno y derivados de tomate han sido:

1. Caracterización del contenido de licopeno en derivados de tomate.
2. Estudio de estabilidad del licopeno en derivados de tomate.
3. Estudio de las alegaciones de salud en el etiquetado relativas al licopeno, de acuerdo con el Reglamento 1924/2006 y posteriores.

Los objetivos específicos del estudio sobre el aceite de oliva han sido:

1. Determinación de parámetros químicos de calidad comercial y calidad diferenciada en muestras de aceite de oliva virgen extra.
2. Evaluación de otros parámetros de calidad de los aceites de oliva virgen extra: contenido de diacilglicéridos y polifenoles totales.
3. Estudio de las alegaciones de salud relativas al aceite de oliva y sus compuestos bioactivos.

## 2.2. PLAN DE TRABAJO

Para dar cumplimiento a estos objetivos se ha realizado el siguiente plan de trabajo.

En cuanto al estudio relativo a los derivados de tomate y licopeno, se ha determinado el contenido inicial de licopeno y su estabilidad a lo largo de 24 meses en 15 derivados de tomate. Esta tarea de investigación ha formado parte del proyecto de investigación OTRI UCM-AGRUCON (2008-2009) y se ha llevado a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), gracias a la obtención de una Beca Colaboración MEC-UCM (2008-2009) y posterior realización del Trabajo de Fin de Master (2009-2010).

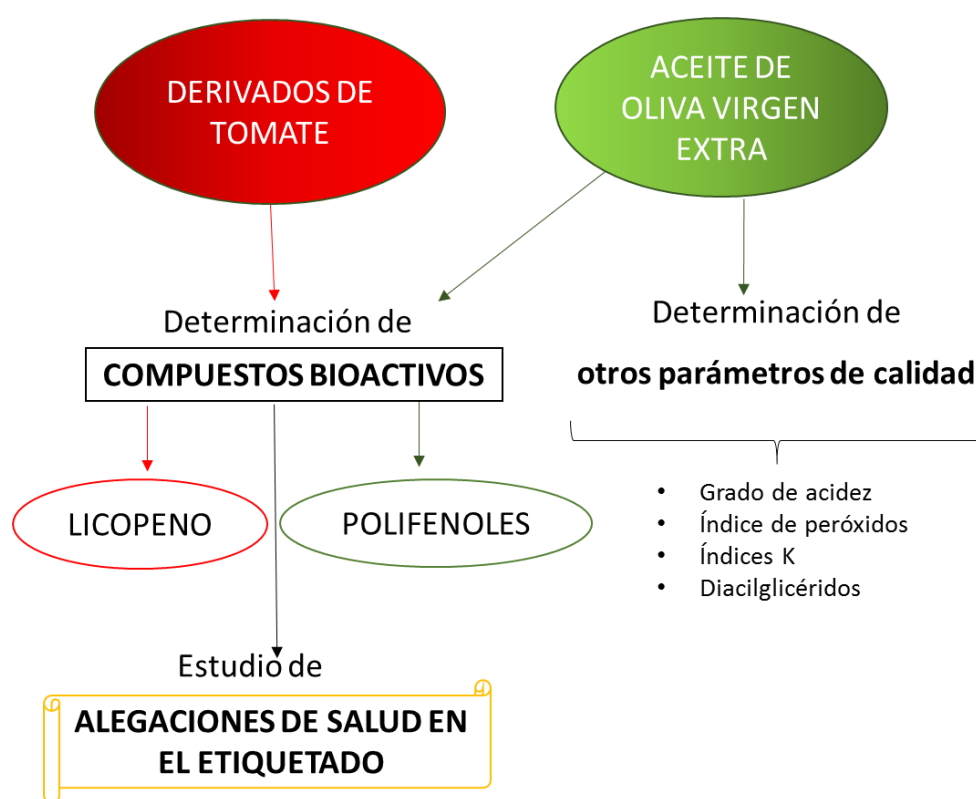
Además, se ha realizado una revisión de los estudios científicos y las solicitudes de las declaraciones de propiedades saludables presentadas a la EFSA relativas al licopeno y derivados de tomate para poder evaluar nuevas alternativas y/o ensayos complementarios relacionados con los marcadores de disminución de factor de riesgo o daño oxidativo, y evaluar estudios apropiados para la justificación de las alegaciones y efectos fisiológicos beneficiosos con el fin de poder valorar la inclusión de una declaración de propiedades saludables referente a las propiedades antioxidantes del licopeno.

Por otra parte, las tareas correspondientes al estudio relativo al aceite de oliva virgen extra se han centrado en el análisis de distintos parámetros químicos para determinar la calidad comercial y diferenciada de seis muestras de aceite de oliva virgen extra tal y como queda establecido en el Reglamento 2568/91 y en sus modificaciones posteriores. Estos parámetros han sido el grado de acidez, el índice de peróxidos y la absorción de la luz en el ultravioleta mediante los índices K. Estos parámetros permiten catalogar un aceite de oliva como virgen, virgen extra o como aceite de oliva virgen extra denominación de origen. Asimismo, se ha valorado el contenido de diacilglicéridos y polifenoles, que aunque no se tienen en cuenta para valorar la calidad comercial del aceite de oliva virgen extra mediante la legislación europea ni la americana, sí están contemplados como parámetros de calidad exigibles por las sociedades alemana y australiana. Estas determinaciones se realizaron en el Departamento Food Science and

Technology de la Universidad de California (Davis) en Estados Unidos durante el curso 2010-2011 gracias a una Beca de Intercambio Académico UCM-Universidad de California (Education Abroad Program Exchange Scholarship), realizándose los ensayos en el laboratorio del Dr. Charles Shoemaker.

Al igual que en el caso del estudio anterior, se ha realizado una revisión del panorama actual relativo a las alegaciones de salud del aceite de oliva virgen extra y de los polifenoles, habiéndose aceptado en este caso tres declaraciones relativas a ambos.

A continuación (figura 2.1) se muestra un esquema del plan de trabajo realizado:



**Figura 2.1. Esquema del plan de trabajo llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral.**



### **3. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE LICOPENO EN DERIVADOS DE TOMATE**

---





### 3.1. IMPORTANCIA DEL TOMATE Y SUS DERIVADOS

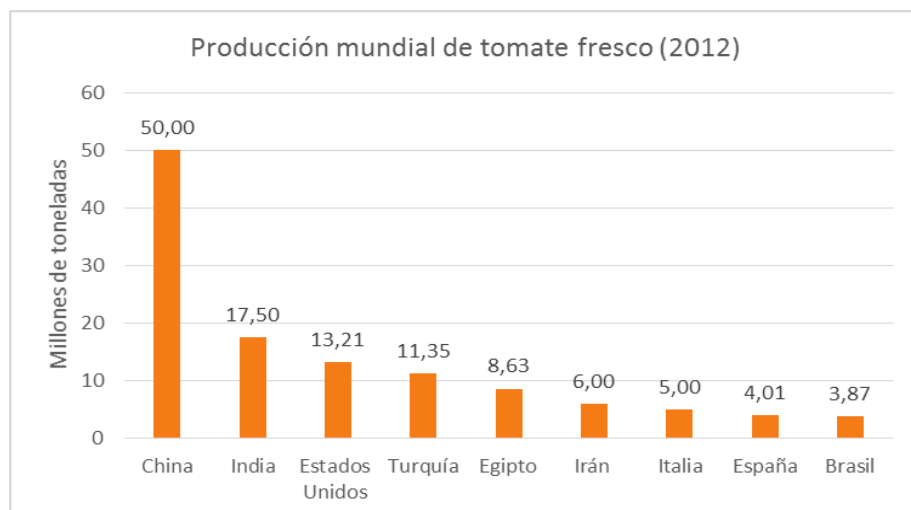
La planta del tomate es originaria de América del Sur, de la amplia zona andina de Chile, Bolivia, Perú y Ecuador. Desde allí se trasladó como una hierba silvestre a América (Méjico), donde pasaría por el proceso de “domesticación” antes de ser introducida en Europa durante la primera mitad del siglo XVI (Jenkins, 1948). Españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio y África, así como a Filipinas, desde donde se extendió a otros países asiáticos.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Peralta y Spooner, 2000) es en la actualidad una de las hortalizas que se producen en mayor proporción a nivel mundial. Durante el año 2013 la producción mundial de frutas y hortalizas ascendió a 1.740 millones de toneladas, lo que significa un aumento del 9,4% respecto a 2012 (producción de 1.590 millones de toneladas), según datos ofrecidos por el Servicio de Información del Mercado Agrícola de Bonn (FAO, 2014). La producción mundial de tomate para fresco se eleva a 162 millones de toneladas, ocupando el undécimo puesto en producción después de productos como el azúcar, maíz, arroz, trigo y patatas según los datos del año 2012<sup>1</sup> de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2014), siendo además la hortaliza de mayor valor económico.

Según estimaciones de la FAO, China, con más de 50 millones de toneladas producidas en 2012, es el mayor productor de tomate del mundo, seguido por India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia y España (figura 3.1) (FAOSTAT, 2014).

---

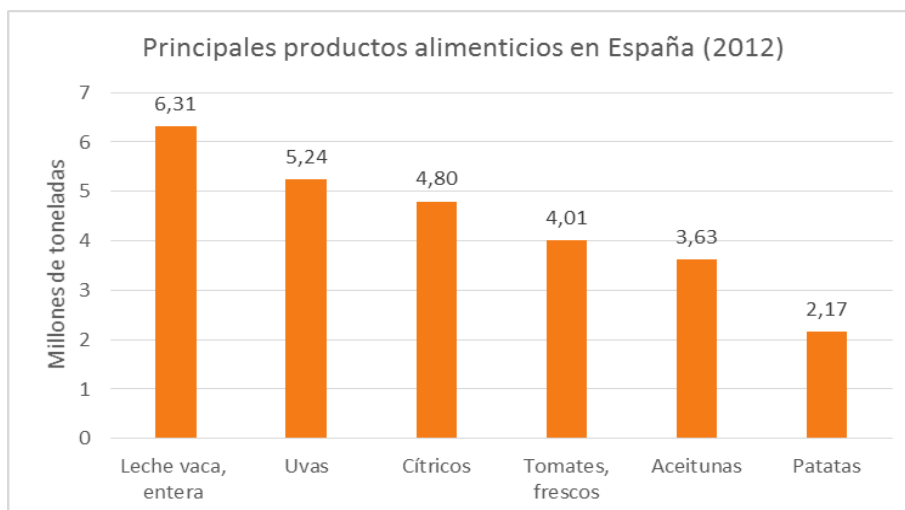
<sup>1</sup> Últimos datos consultados disponibles en la FAO a nivel mundial.



**Figura 3.1. Principales países productores de tomate fresco (2012) (FAOSTAT, 2014).**

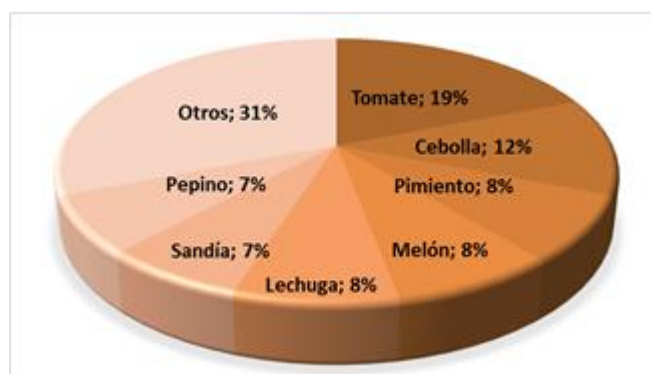
En la Unión Europea, la producción de hortalizas, sin incluir las patatas que por sí solas suponen casi 55 millones de toneladas, supera anualmente los 60 millones de toneladas, donde el principal cultivo es el tomate con unos 20 millones de toneladas. España es el segundo mayor productor hortofrutícola europeo, por detrás de Italia, con una producción total que ronda los 30 millones de toneladas (MERCASA, 2013), convirtiéndose en el segundo país productor de tomate de la Unión Europea después de Italia.

En España, el tomate es el cuarto producto alimenticio con mayor producción después de la leche, la uva (para vinificación) y los cítricos, con un total de unos 4 millones de toneladas producidas en el año 2012, lo que da idea de su importancia económica (figura 3.2).



**Figura 3.2. Principales productos alimenticios producidos en España (2012) (basado en FAOSTAT, 2014).** Nota: el grupo de cítricos incluye, naranjas, tangerinas, mandarinas, clementinas y satsumas.

En la siguiente figura 3.3 se muestra el porcentaje que representa la producción de las principales hortalizas en España con respecto al total. Dentro de este grupo, el tomate es el mayoritario y abarca el 19% de la producción total.



**Figura 3.3. Producción media de hortalizas en España entre los años 2008 y 2012 (MAGRAMA, 2014).**

En los últimos años, en España se ha producido un incremento de la producción debido principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada (MAGRAMA, 2014).

Según el Panel del Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura, el consumo de tomate fresco en España en el año 2013 fue de 688,605 millones de kg (MAGRAMA, 2013), lo que supone un consumo por persona y año de aproximadamente de 15,17 kg. Dentro de las hortalizas, el tomate fue el producto más consumido después de la patata (tabla 3.1).

Como se ha visto en la figura 3.2, la cantidad de patata producida en España es bastante inferior a la de tomate, a pesar de que el consumo de ésta es superior. Esto se puede explicar porque cerca del 65% de la patata que se consume en España procede de otros países, particularmente de Francia. España es el cuarto importador de patata del mundo, siendo la importación de este tubérculo en el año 2011<sup>2</sup> de 662.454 toneladas (FAOSTAT, 2014).

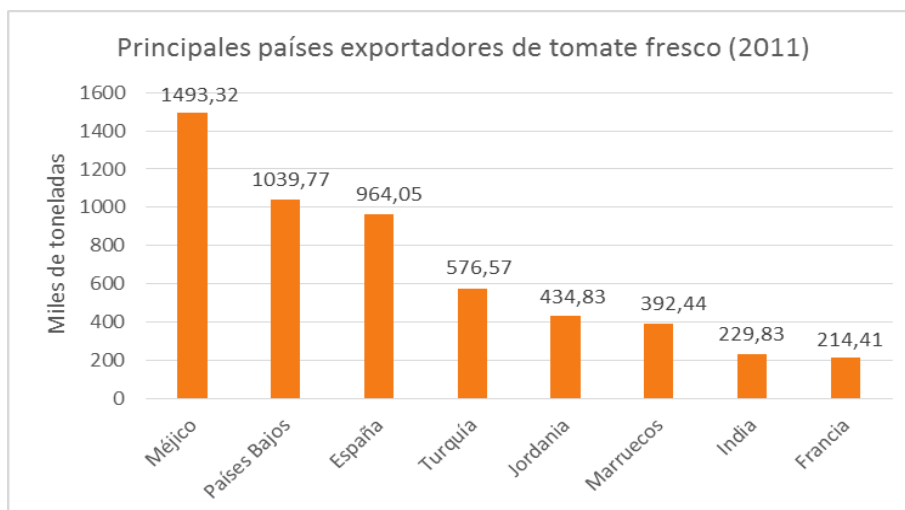
**Tabla 3.1. Consumo de patatas y hortalizas frescas en España en el año 2013.**

Producto	Volumen (millones de kg)	Valor (millones de €)	Precio medio kg (€)	Consumo per cápita (Kg)	Gasto per cápita (€)
<b>Total patatas</b>	1.424	1.218	0,86	31,35	26,82
<b>Total de hortalizas frescas</b>	2.924	4.627	1,58	64,39	101,89
<b>Tomates</b>	689	918	1,33	15,17	20,2

Respecto a las exportaciones de tomate, en el año 2011 Méjico fue el país que presentó mayores cifras de exportación de tomate fresco, seguido de Países Bajos, y en tercer lugar, España (figura 3.4).

---

<sup>2</sup> Los últimos datos disponibles sobre importación y exportación consultados en FAOSTAT corresponden al año 2011, no existiendo hasta la fecha, datos del 2012.

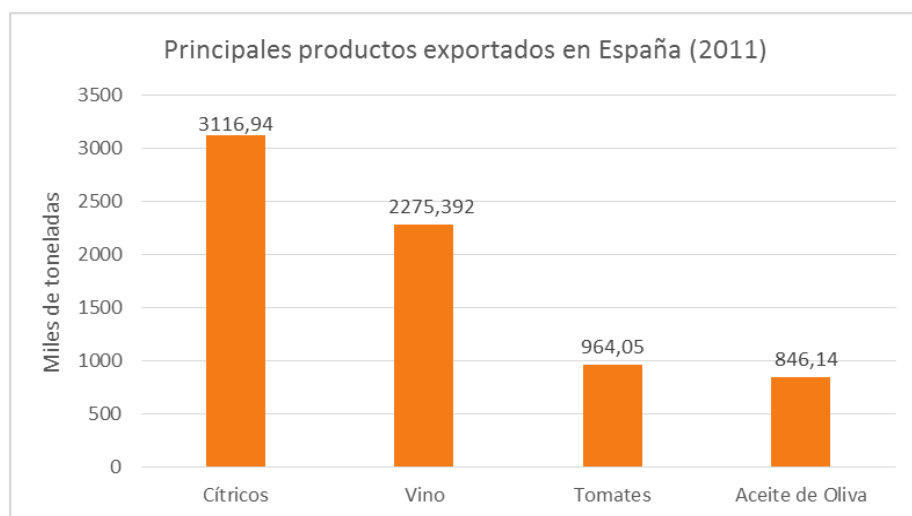


**Figura 3.4. Principales países exportadores de tomate (2011) (FAOSTAT, 2014).**

El hecho de que los Países Bajos, no teniendo una producción de tomate elevada (805.000 t en el año 2012, FAOSTAT, 2014), sea uno de los principales exportadores a nivel mundial se justifica porque Holanda, Bélgica y Luxemburgo aprovechan su capacidad comercial para la canalización de producciones de otros orígenes, sobre todo de España en el ciclo otoño-invierno. En época estival, Holanda se convierte en el principal suministrador europeo (Bélgica es importador de tomate holandés, español e italiano, y a su vez es exportador hacia Francia y Alemania). Italia, si bien es un gran productor, no tiene un sector exportador pujante.

España es el primer exportador de frutas y hortalizas de la Unión Europea y uno de los tres primeros exportadores mundiales junto con China y EEUU. Los principales productos que se exportan son los de invernadero (tomate, pimiento, pepino), los cítricos y el melocotón (MAGRAMA, 2014). El sector del tomate tiene una clara vocación exportadora ya que el 47% de la producción (media 2008 – 2012) se destina a la exportación, siendo además el primer subsector dentro del conjunto de las exportaciones del sector agroalimentario. Las exportaciones tienen una evolución creciente en los últimos años tanto en volumen como en valor, destacando las exportaciones de tomate a países de la Unión Europea, principalmente a Alemania, Francia, Países Bajos, Reino Unido y Polonia

(MAGRAMA, 2014). El total ascendió en 2011 a 964.054 toneladas y fue el tercer producto que más se vendió a otros países después de los cítricos y el vino (figura 3.5).



**Figura 3.5. Principales productos exportados en España (2011) (FAOSTAT, 2014).** Nota: el grupo de cítricos incluye, naranjas, tangerinas, mandarinas, clementinas y satsumas.

En cuanto al valor económico de las exportaciones españolas, los cítricos representan el grupo de productos más importante económicamente en las exportaciones españolas. El vino generó en el año 2011, 3.029 millones de dólares, seguido por el aceite de oliva (virgen) con una producción de 2.574 millones de dólares, y el tomate 1.182 millones de dólares.

Los principales países importadores de tomate en el año 2011 fueron Estados Unidos (1.491.017 t), Rusia (730.007 t), Alemania (706.671 t), Francia (519.052 t), Reino Unido (414.381 t) y Países Bajos (207.401 t). El tomate que importa Alemania es en su mayoría holandés, español, belga e italiano. El tomate de importación francés es español y marroquí. En Reino Unido, el tomate español representa el 63% de las importaciones y el holandés el 30%. Holanda como clásico re-exportador de tomate español importa de España. Es decir, dentro de la Unión Europea el tomate español es importado sobre todo por Alemania, Francia, Reino Unido y Holanda. Con independencia de la producción, España importó ese año 144.608 t (FAOSTAT, 2014) para cubrir las necesidades de exportación a otros países y consumo dentro del país.

Aunque en este trabajo se han manejado datos del año 2011 ó 2012 en función de la disponibilidad en la página web de la FAO para poder realizar una comparación con otros países del mundo, se han consultado también datos más recientes disponibles en EUROSTAT (Statistical Office of the European Communities) o FEPEX (Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas) para mostrar estadísticas más actuales en España. Así, datos de EUROSTAT (2014) indican una producción de tomate fresco en el año 2014 de 4.121.700 toneladas, producción casi idéntica a la del año 2012 comentada previamente. Datos disponibles en FEPEX (2014) muestran una exportación de 624.401 toneladas, inferior a la del 2011, y una importación de 79.870 toneladas, que supone casi la mitad que en el año 2011.

El tomate fresco se consume principalmente en ensalada y también se utiliza como ingrediente en varias preparaciones culinarias como tomate frito o cocido. Aproximadamente dos tercios de la producción de tomate se destinan para el consumo en fresco y el resto para su transformación para dar lugar a derivados como salsas, purés, zumos, conservas de tomate entero, pelado, gazpacho, etc.

El consumo per cápita de tomate procesado más elevado a nivel mundial durante los últimos cinco años se registró en Australia, Nueva Zelanda, Norte América y Europa, con unas cantidades medias de alrededor de 20 kg/persona/año. La cantidad total de derivados de tomate consumidos durante el año 2012/2013 en la Unión Europea (15 países) fue de 7.600.315 toneladas (Tomato News, 2014).

Con casi 5 millones de toneladas de tomate procesado de media en los últimos cinco años, Italia es el procesador de tomate más grande de la región AMITOM (Association Méditerranéenne internationale de la Tomate). En los últimos cinco años, la industria italiana ha sido responsable del 20% del comercio de los derivados de tomate en todo el mundo. Italia no es sólo un gran productor en términos de cantidades transformadas, sino también en términos de intensidad y diversidad de su comercio exterior. Es con la categoría de tomate en lata donde Italia domina el mercado. A pesar de la creciente presencia de España y Estados Unidos en este sector, la competencia sigue siendo leve y



en los últimos cinco años, Italia ha registrado más de tres cuartas partes de los suministros intercambiados en todo el mundo. La Unión Europea representa el mercado principal, aunque no el único, para las ventas al exterior de Italia: el 60% de las exportaciones de pasta de tomate y tomate en lata del país y el 75% de sus ventas al exterior de salsas y ketchup se destinaron a los mercados de la Comunidad Europea en los últimos cinco años. Alemania, Francia, el Reino Unido y Bélgica absorbieron la mayor parte de la exportación de pasta de tomate, tomate en lata y salsas de tomate de la industria italiana (Tomato News, 2014).

En el caso concreto de España, en el año 2013, la producción de tomate destinada al procesado fue de 1.650.000 toneladas, y la previsión para el 2014 es de alrededor de 2.400.000 toneladas (WPTC, 2014). Andalucía, Murcia y Canarias son las zonas productoras más importantes de tomate fresco, mientras que el cultivo de los tomates destinados a la industria tiene lugar principalmente en las áreas donde se localizan las fábricas: cerca de tres cuartos del tonelaje en Extremadura (irrigado por el río de Guadiana), 10% en Andalucía, 12% en el valle del Ebro (Navarra, Rioja y Aragón), y el resto en otras áreas como Toledo, Murcia, Valencia, y el delta de Ebro (MAPA, 2014).

### 3.1.1. TIPOS DE DERIVADOS DE TOMATE

El **zumو de tomate** está regulado por el Real Decreto 781/2013 de zumos de frutas. Este Reglamento define el **zumо de frutas** como el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede. Se podrán reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta. Cuando los zumos se obtengan a partir de frutas que incluyan pepitas, semillas y pieles, como es el caso del zumo de tomate, éstas no se incorporarán en el zumo. También autoriza la mezcla de zumos de frutas y de puré de frutas en la producción del zumo de frutas.

**Zumo de frutas a partir de concentrado:** el producto obtenido al reconstituir zumo de frutas concentrado (definido a continuación) con agua potable que cumpla los criterios establecidos en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

El zumo de frutas a partir de concentrado se preparará según procesos de fabricación apropiados que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de un tipo medio de zumo de la fruta de la que procede.

**Zumo de frutas concentrado:** el producto obtenido a partir de zumo de una o varias especies de fruta por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, la eliminación de agua será de al menos un 50 %.

Tanto en el zumo de frutas a partir de concentrado como en el zumo de frutas concentrado se podrán reincorporar el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.

**Néctar de frutas:** el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado que se obtenga por adición de agua con o sin adición de azúcares y/o de miel a los productos definidos anteriormente, al puré de frutas, y/o al puré de frutas concentrado, y/o a una mezcla de estos productos. En el caso del néctar de frutas a partir de tomate, el contenido mínimo de zumo y/o puré deberá ser del 50 % del volumen de producto acabado.

A los zumos de frutas, los zumos de frutas a partir de concentrado y los zumos de frutas concentrados se les podrán añadir los aromas, las pulpas y las células restituidos, y a los néctares de fruta los aromas, pulpas y células restituidos; azúcares y/o miel en una cantidad no superior al 20 % en peso respecto al peso total de los productos acabados, y/o edulcorantes.

El zumo de frutas reconstituido y el puré de frutas reconstituido de tomate deberán tener un mínimo de 5° Brix.

Se entiende como **tomate en conserva** (CODEX STAN 13-1981) “el producto preparado con tomates frescos, maduros y lavados que se ajusten a las características del fruto de *Lycopersicon esculentum* P. Mill, de las variedades rojas o rojizas, que estén limpios y sanos. A los tomates se les quitarán los pedúnculos y cálices y cuando sea necesario, el corazón; envasado con o sin un líquido de cobertura apropiado, y aderezos apropiados para el producto; y tratado térmicamente antes o después de haber sido cerrado herméticamente en un envase para evitar su deterioro”.

Los tomates en conserva que se presentan con las denominaciones que se indican a continuación se preparan enteros o en trozos. Los tomates enteros normalmente se preparan con frutos pelados; si los tomates no se han pelado, la denominación de la forma de presentación deberá completarse indicando la palabra “sin pelar”:

- Enteros: Tomates cuya forma no se ha alterado después de su elaboración.
- No enteros (en trozos): Tomates machacados o cortados en trozos cuya forma puede ser irregular o regular.

Para los tomates en trozos, la forma de presentación deberá especificarse de acuerdo con el tipo de corte o molienda:

- En cubos: tomates cortados en cubos.
- En lonjas (rodajas): tomates cortados perpendicularmente al eje longitudinal en círculos de grosor uniforme.
- En cuñas: tomates cortados en cuatro partes aproximadamente iguales.
- Pulpa, tomates machacados, o tomates picados: tomates convertidos en pulpa, machacados, o picados, según corresponda.

El **concentrado de tomate** es “el producto obtenido mediante la concentración de zumo de tomate, envasado en un envase adecuado, con un contenido de materia seca igual o superior al 12%; los preparados de tomate concentrado que tengan un contenido de materia seca que no sobrepase el 18% o que esté comprendido entre el 18 y el 24% podrán contener una cantidad de piel y pepitas que no exceda del 4% del peso del

producto, en el primer caso, y del 7%, en el segundo” (Reglamento (CE) 1535/2003). El concentrado de tomate podrá considerarse como "Puré de tomate" o "Pasta de tomate" cuando cumpla estos requisitos (CODEX STAN 57-1981):

- **Puré de tomate** - concentrado de tomate que contenga no menos de 8%, pero menos de 24% de sólidos solubles naturales de tomate.
- **Pasta de tomate** - concentrado de tomate que contenga 24%, o más, de sólidos solubles naturales de tomate.

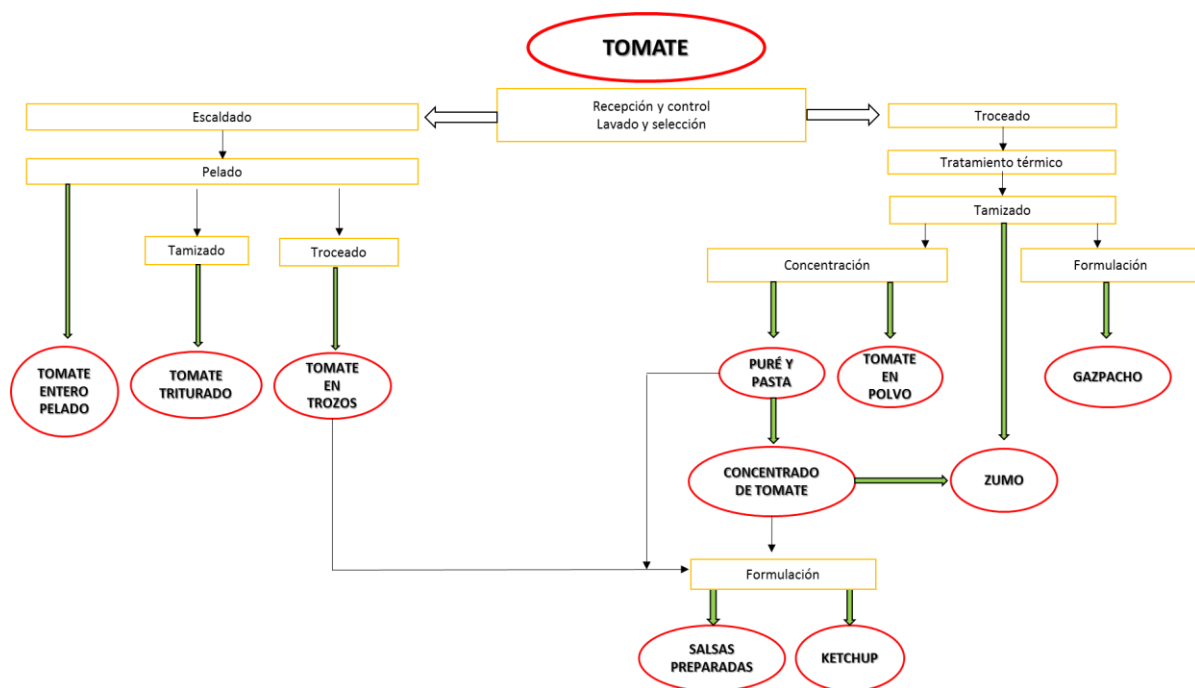
Las **salsas preparadas** son “los preparados especiales a base de tomate obtenidos mediante la mezcla de alguno o varios productos de tomate con otros productos de origen vegetal o animal (excepto tomates frescos), tratados térmicamente, envasados en recipientes cerrados herméticamente en los que el peso neto de los productos represente como mínimo el 60% del peso neto total de la salsa preparada; estos productos deberán ser elaborados por el mismo transformador” (Reglamento (CE) 1535/2003). Dentro de las salsas, el **tomate frito**, salsa típicamente española “es el producto formulado a partir de tomate en cualquiera de sus formas de utilización (tomate natural, zumo de tomate, puré, pasta o concentrado de tomate) y sometido a un proceso de cocción con aceite vegetal comestible, con la adición facultativa de otros ingredientes autorizados, envasados en recipientes cerrados herméticamente y conservado mediante el tratamiento térmico adecuado” (Real Decreto 858/1984).

El **kétchup, catsup o catchup**, característica salsa americana, “es el producto preparado a partir de tomate en cualquiera de sus formas de utilización (tomate natural, zumo de tomate, puré, pasta o concentrado de tomate), sazonado con sal, vinagre, azúcares y especias, y con la adición facultativa de otros ingredientes autorizados, envasados en recipientes convenientemente cerrados y adecuadamente conservados” (Real Decreto 858/1984).

El **gazpacho** es otro derivado de tomate o producto a base de tomate fresco. Según la Real Academia Española, el gazpacho es un “género de sopa fría que se hace regularmente con pedazos de pan y con aceite, vinagre, sal, ajo, cebolla y otros

aditamentos”. Existen multitud de tipos de gazpachos, que se dividen en dos grandes grupos: el gazpacho llamado andaluz (sopa fría de hortalizas crudas, espesada con miga de pan y condimentada con aceite, sal y vinagre) y el gazpacho manchego (guiso elaborado con carne y torta hecha de masa de pan sin fermentar). El primero es la combinación de dos herencias gastronómicas: el legado romano que aportó el pan, el aceite de oliva y el ajo, y las novedades traídas de América que son el tomate y el pimiento (Torija *et al.*, 2007).

En la figura 3.6 se representa un esquema de la obtención de los distintos derivados de tomate a partir del tomate fresco.



**Figura 3.6. Esquema de producción de derivados de tomate**  
(adaptado de Del Valle-Ávila, 2004).

Los frutos de tomate son transportados desde las áreas de cultivo hasta las distintas industrias donde se realizan los controles pertinentes de materiales extraños, color, etc. Antes de llevar a cabo el procesamiento del producto, la materia prima se lava para eliminar los residuos contaminantes y se seleccionan los tomates más adecuados para los tratamientos posteriores. A continuación, los tomates se someten a tratamiento térmico

(unos 95° durante unos minutos) en lo que se denomina escaldado para reducir el número de microorganismos y aumentar la densidad del producto. Después de este proceso, se realiza el pelado mediante choques de temperatura o con soluciones de hidróxido de sodio entre otros, consiguiendo tomate entero pelado, y más tarde se trocea mediante cuchillas de acero, obteniéndose tomate troceado que podrá ser utilizado como producto final. Una vez troceados, se aplica al producto un tratamiento térmico para inactivar las enzimas presentes en el fruto, y a continuación se tamiza para extraer el jugo y eliminar pieles, semillas y materiales de desecho. El jugo obtenido se lleva a un evaporador para realizar su concentración, que posteriormente se esteriliza, dando lugar al concentrado de tomate. A partir de aquí, se llevan a cabo los procesos correspondientes para la elaboración de otros derivados como los zumos, salsas, ketchup y gazpacho. Por último, se procede al envasado y acondicionamiento de los productos obtenidos (Del Valle-Ávila, 2004).

### 3.1.2. TOMATE Y SALUD

El tomate es uno de los vegetales más consumidos debido en parte a que se puede consumir de varias formas, crudo en ensaladas, cocinado, formando parte de salsas... pero además posee importantes cualidades nutricionales. El contenido en agua de esta fruta es aproximadamente del 94%, el 50-70% de los sólidos totales lo constituyen los hidratos de carbono, en concreto los azúcares como glucosa y fructosa (Yúfera, 1998). Además, es fuente importantísima de compuestos bioactivos antioxidantes como carotenoides (licopeno), compuestos fenólicos, posee un alto contenido en vitaminas (destacando la vitamina C, vitaminas del grupo B en especial los folatos y el  $\beta$ -caroteno), tiene un bajo contenido en grasa (0,2%) con lo que el aporte de calorías es bajo (unas 18 kilocalorías por 100 gramos), y es una buena fuente de fibra y potasio. Todas estas características aportan al tomate un importante valor añadido desde el punto de vista del consumidor (Willcox *et al.*, 2003; Candelas-Cadillo *et al.*, 2005; Fernández-Ruiz *et al.*, 2007).

El consumo de derivados de tomate se asocia a una disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular. Se ha visto que el consumo de zumo de tomate y otros derivados reduce el riesgo de formación de placa de ateroma disminuyendo los marcadores de esteatosis, triglicéridos plasmáticos y las proteínas de muy baja densidad VLDL. Además incrementa el metabolismo lipídico induciendo la sobreexpresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos de una forma más eficiente (Martín-Pozuelo *et al.*, 2014). Además, el consumo de zumo de tomate parece estar relacionado con la mejora de la disfunción endotelial en pacientes con síndrome metabólico y favorece el control glucémico debido a una disminución de la resistencia a la insulina (Tsitsimpikou *et al.*, 2014).

Dentro de las sustancias bioactivas presentes en el tomate y derivados hay que destacar la presencia del carotenoide licopeno. Químicamente los carotenoides son terpenoides, formados básicamente por ocho unidades de isopreno. Los elementos químicos que forman la estructura de los carotenoides naturales son carbono e hidrógeno y en ocasiones también oxígeno. Dentro de los carotenoides podemos distinguir dos grupos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, que poseen oxígeno en su molécula. El oxígeno en las xantofilas puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

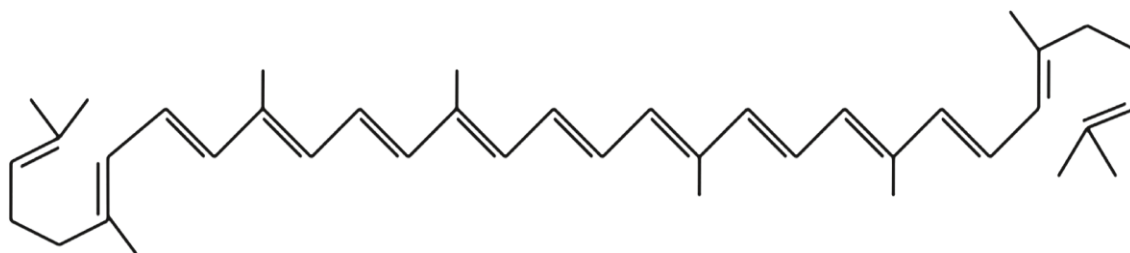
Los carotenoides son los pigmentos responsables de la mayoría de los colores amarillos, anaranjados y rojos de frutos y verduras, debido a la presencia en su molécula de un cromóforo consistente total o principalmente en una cadena de dobles enlaces conjugados. Están presentes en todos los tejidos fotosintéticos, junto con las clorofilas, así como en tejidos vegetales no fotosintéticos, como componentes de cromoplastos. Tanto las formas naturales como las sintéticas se pueden añadir a los productos alimenticios como aditivo alimentario utilizándose también como colorante de los alimentos. Son muchos los factores que influyen en el contenido de carotenoides de las plantas. En algunas frutas, la maduración puede ocasionar cambios drásticos de los carotenoides. La luz estimula la biosíntesis de carotenoides, por lo que el aumento a la

exposición solar aumenta su concentración. Otros factores que alteran la presencia y cantidad de carotenoides son el clima y las condiciones de cultivo (Goodwin, 1971).

En cuanto a su actividad, algunos carotenoides como el  $\alpha$ -caroteno, el  $\beta$ -caroteno y el  $\gamma$ -caroteno son precursores de la vitamina A, convirtiéndose en esta vitamina cuando el organismo la necesita. Sin embargo, carotenoides como el fitoeno o el licopeno carecen de esta actividad provitamínica. Se estima que los carotenoides pro-vitamina A presentes en frutas y hortalizas proporcionan el 30-100% de las necesidades de vitamina A de las poblaciones humanas. El carotenoide hallado más frecuentemente en los tejidos vegetales es el  $\beta$ -caroteno, que a bajas dosis y combinado con vitaminas C y E, ha mostrado una cierta protección frente a procesos neoplásicos en fumadores (Tur Mari, 2013). Por otra parte, la estructura de estos compuestos contribuye a la actividad química de los mismos sobre los agentes oxidantes o radicales libres, efecto relevante en la actividad *in vivo* que pueden desarrollar los carotenoides en aquellos individuos que consumen grandes cantidades de los mismos en la dieta.

En el caso concreto del licopeno, se trata de un pigmento hidrocarbonado alifático, compuesto por ocho unidades de isopreno, liposoluble, cuya biosíntesis tiene lugar en el interior de los plastos (Britton, 1995; Periago *et al.*, 2001) (figura 3.7). Puede presentarse como isómero *cis* e isómero *trans*, si bien, salvo pocas excepciones, su forma natural en las plantas es la configuración *trans*, que es la forma química termodinámicamente más estable. Aunque la forma predominante en los alimentos es *all-trans*, la biodisponibilidad es mayor para la forma *cis* (Unlu *et al.*, 2007), debido a que estas moléculas son más cortas, tienen menor tendencia a precipitar en el tracto gastrointestinal y muestran una mayor solubilidad en las micelas, lo que hace que se incorporen más fácilmente a los quilomicrones. Algunos autores indican que después o durante el proceso de absorción se produce una intensa isomerización, lo que explica los elevados niveles de *cis*-licopeno encontrados en plasma (Britton *et al.*, 1995; Boileau *et al.*, 2002).



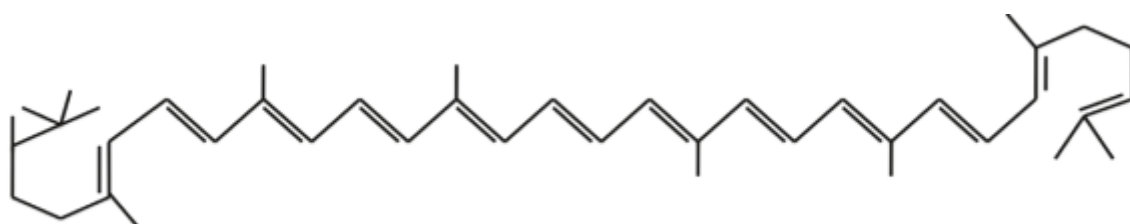


**Licopeno**

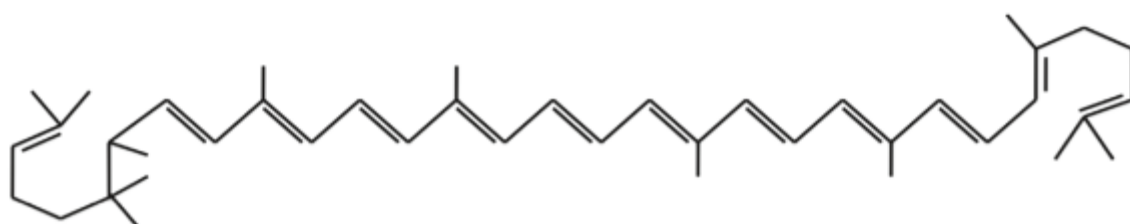
Peso molecular: 536,89

Fórmula molecular: C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>

Composición molecular: C: 9,49%; H: 10,51%



**Licopeno 1,2-epóxido**



**Licopeno 5,6-epóxido**

**Figura 3.7. Estructura química del licopeno y sus principales metabolitos (basado en Cámara *et al.*, 2013a).**

Los isómeros *cis* del licopeno presentan distintas características y comportamiento que los isómeros *trans*: disminución de la intensidad de color, menor punto de fusión, menor coeficiente de extinción molar y cambio en el valor máximo de absorción en el espectro ultravioleta visible (Zechmeister y Polgar, 1944; Periago *et al.*, 2001).

El licopeno se encuentra en nuestra dieta formando parte del tomate, sandía, papaya, albaricoque, pomelo rosa, zanahoria o pimiento entre otros.

El contenido de licopeno en el tomate fresco varía significativamente de acuerdo con las distintas variedades de tomate, el grado de madurez y las condiciones estacionales. El licopeno se puede encontrar en cantidades muy variables. Las variedades silvestres de *Solanum pimpinellifolium* son las que muestran las cantidades más elevadas (0,59-43,1 mg/100 g), mientras que en algunas variedades de *Solanum esculentum* (especie cuyas variedades se comercializan) los valores más altos son de aproximadamente 40 mg/100 g (Periago *et al.*, 2001; Fernández-Ruiz, 2009).

El licopeno, como principal carotenoide presente en el tomate, se encuentra en sus productos derivados en cantidades variables dependiendo del origen de la materia prima y de los distintos tratamientos tecnológicos aplicados (tabla 3.2).

**Tabla 3.2. Contenido de carotenoides (mg/100 g) en distintos tipos y derivados de tomate (Basado en Maiani *et al.*, 2009).**

	Luteína	β-caroteno	Licopeno
Tomate	0,05-0,21	0,32-1,50	0,85-12,70
Tomate cherry	n.d-0,03	0,30-1,10	0,80-12,00
Tomate en lata	n.d	0,22-0,28	8,48-11,82
Zumo de tomate	0,03	0,37	1,02-11,00
Concentrado de tomate	-	-	49,30-94,00
Puré de tomate	n.d	0,38-0,55	13,16-26,11
Kétchup	n.d	0,14-0,50	4,71-23,40

-: no incluido en la(s) referencia(s), n.d.: no detectado o cuantificado.

La degradación del licopeno en los derivados de tomate comerciales no solo afecta a la intensidad del color, sino también al valor funcional y nutricional de estos productos, actuando como antioxidantes del producto final. De hecho, la estabilidad del licopeno es crítica para los efectos beneficiosos sobre la salud, con lo que resulta esencial preservar su contenido en los productos alimenticios. La mayoría de los productos comerciales de

tomate tienen una vida útil larga, lo que hace que las pérdidas de licopeno sean acusadas al final de este periodo (Mayeaux, *et al.*, 2006).

En cuanto a la biodisponibilidad, el licopeno es liposoluble, y tras su ingestión, es rápidamente absorbido en el intestino junto con la grasa dietética en una proporción de entre el 7 y 10%, y distribuido a los tejidos corporales, principalmente al hígado, glándulas adrenales y órganos sexuales (Erdman, 2005).

Hay que tener en cuenta que la matriz en la que se encuentra incluido el licopeno influye significativamente en la biodisponibilidad de éste, siendo mayor en los productos de tomate procesados que en los frescos (Unlu *et al.*, 2007). La absorción se produce tras liberarse de la matriz que lo contiene, y se favorece calentando la matriz o disminuyendo el tamaño de partícula. Así, se encuentra más cantidad de este carotenoide en aquellos productos en los que se les ha aplicado algún tratamiento, ya que de esta forma el licopeno se libera de las células (Xianquan *et al.*, 2005). Esto se observa al apreciar las diferencias de contenido de este compuesto en el tomate triturado, donde se detecta una cantidad significativamente mayor que en el entero pelado. De la misma forma, los tratamientos térmicos liberan el licopeno, detectándose mayor contenido en los tomates fritos, ketchup y zumos en comparación con los tomates triturados o entero pelado, hecho que también puede ser debido a los efectos de la concentración y deshidratación aplicados durante el procesado industrial (García-Alonso *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010).

Por otra parte, la ingesta de licopeno junto con aceite puede influir aumentando su biodisponibilidad (Ahuja *et al.*, 2006). Fielding *et al.* (2005) observaron que el consumo de tomates cocinados con aceite de oliva aumentaba notablemente la concentración de licopeno en plasma en comparación con los tomates no cocinados con este aceite. Este hecho se puede explicar porque la grasa es necesaria para la liberación del licopeno de la matriz y para la incorporación en las micelas formadas en el intestino y su paso posterior a los quilomicrones (Clinton, 1998). Otra explicación por la cual el licopeno se absorbe mejor si se ingiere con alimentos que contienen aceite, es porque la grasa estimula la secreción de ácidos biliares que favorecen la formación de las micelas. Por ello, el

licopeno procedente de los productos que contengan aceite en su composición, como las salsas de tomate y el gazpacho, se absorberá con mayor facilidad.

El licopeno es el carotenoide que se encuentra en mayor proporción en plasma, junto con la luteína, el  $\beta$ -caroteno y el  $\gamma$ -caroteno alcanzando una concentración de entre 220 a 1168 nmol/L en sujetos sanos (585nmol/L de media) (Giuliano *et al.*, 1994; Clinton *et al.*, 1998; Rao y Agarwal, 1998). El pico de concentración máximo de licopeno en plasma se detecta a las seis horas después de la ingestión (Porrini *et al.*, 1998) teniendo posteriormente un tiempo de vida media de 12 a 20 horas (Levy *et al.*, 1995).

En plasma, el licopeno aparece unido a las lipoproteínas, fundamentalmente a las LDL, las cuales transportarán el licopeno a los diferentes tejidos (During y Harrison, 2004). Las principales áreas corporales de distribución de este compuesto bioactivo, ya que no se distribuye por igual en todos los tejidos, son, como ya se ha mencionado, los testículos, la glándula adrenal, la próstata, el hígado, el tejido adiposo, los riñones y los ovarios (Johnson, 1998; Goralczyk y Siler, 2004; Erdman, 2005).

El *trans*-licopeno puede isomerizarse a *cis*-licopeno mediante calentamiento a 50°C aunque al cabo de 9 horas se produce la degradación del compuesto, mientras que a 100 y 150°C la degradación se produce más rápido que la isomerización (Schieber y Carle, 2005).

El licopeno es generalmente bien tolerado por la población y no se conocen contraindicaciones, efectos secundarios, ni teratogénicos. Únicamente se ha descrito una manifestación por ingesta excesiva de licopeno (alrededor de 2 litros de zumo de tomate al día), denominado licopenemia, que consiste en una elevada concentración de licopeno en la sangre, lo que produce una pigmentación amarillo-anaranjada de la piel pero sin alteraciones de la salud, y la cual es reversible tras disminuir la ingesta de licopeno (Reich *et al.*, 1960).

Numerosos estudios ponen de manifiesto la gran capacidad antioxidante de los carotenoides (Beutner *et al.*, 2001). El licopeno en concreto no tiene actividad

provitamínica A, pero muestra una capacidad antioxidante superior a la de otros carotenoides siendo dos veces más alta que la del  $\beta$ -caroteno, por lo que su presencia en la dieta se considera de gran interés (Ordóñez *et al.*, 2009). El mecanismo de acción antioxidante del licopeno deriva de su capacidad de secuestrar radicales libres, tanto *in vitro* como *in vivo* (Periago *et al.*, 2001). El licopeno se absorbe desde las distintas fuentes dietéticas, distribuyéndose a los tejidos corporales donde mantiene sus propiedades antioxidantes.

Además, el incremento de licopeno en plasma parece regular las funciones de algunos genes, el metabolismo, la comunicación intercelular, modular la respuesta hormonal, y en consecuencia disminuir el riesgo de diferentes enfermedades crónicas. Sin embargo, el mecanismo de acción no está claramente establecido (Lee *et al.*, 2000). Diversos investigadores han estudiado los posibles efectos beneficiosos del licopeno en diferentes enfermedades y se han sugerido distintos tipos de actividad biológica: inhibición de la proliferación celular, efecto anti-carcinogénico y actividad anti-aterogénica (Agarwal y Rao, 2000).

Los radicales libres u oxidantes producen la oxidación de lípidos, proteínas y ADN favoreciendo la aparición de enfermedades, siendo el estrés oxidativo uno de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. Se ha observado el efecto protector del licopeno sobre el estrés oxidativo, en la enfermedad cardiovascular, la hipertensión, la aterosclerosis, el cáncer y la diabetes. Existen diversos estudios epidemiológicos y revisiones sistemáticas de relevante evidencia científica (estudios multicéntricos) que sugieren que el consumo de licopeno tiene un efecto beneficioso para la salud, en la prevención del desarrollo de ciertos tipos de enfermedades degenerativas gracias a su acción antioxidante (Kohlmeier *et al.*, 1997; Giovannucci, 1999; Giovannucci, 2002; Basu e Imrhan, 2007; Kong *et al.*, 2010).

En cuanto a la **enfermedad cardiovascular**, el licopeno tiene un papel importante en la modulación del metabolismo lipídico. Es conocido que las concentraciones elevadas de colesterol LDL en el plasma están relacionadas con un aumento del riesgo de padecer

enfermedad cardiovascular. El licopeno, al tratarse de un isoprenoide, es sintetizado en las plantas y células animales a partir del mevalonato por la vía del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (o HMG-CoA reductasa), enzima que interviene en la síntesis de colesterol y otros isoprenoides. Los inhibidores competitivos de esta enzima inducen la expresión de los receptores LDL en el hígado, lo que aumenta el catabolismo de las LDL plasmáticas disminuyendo así la concentración de colesterol. El licopeno ejerce un efecto antiolesterolemiante ya que reduce la expresión de la enzima HMG-CoA reductasa de una manera dosis y tiempo dependiente, y como consecuencia produce una reducción de los niveles de colesterol en las células y una disminución del riesgo de formación de placa de ateroma y la consiguiente aterosclerosis (Paloza *et al.*, 2010). Otros mecanismos que podrían explicar la prevención de la aterosclerosis incluirían el efecto del licopeno sobre la disminución del daño endotelial o la reducción de la respuesta inflamatoria a través de cambios en la producción de citoquinas (Paloza *et al.*, 2010). Como ya hemos visto, el licopeno, al captar las especies reactivas de oxígeno, disminuye la oxidación de las células y además modula la producción de enzimas productoras de ROS, como la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la 5-lipooxigenasa (5-LOX), controlando las reacciones redox en las vías en las que actúan estas enzimas. Parece también inhibir la cascada pro-inflamatoria generada por los macrófagos a través de la inhibición que el licopeno ejerce sobre ciertas moléculas implicadas como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) y otras moléculas de adhesión (Hung, *et al.*, 2008).

El licopeno también tiene un importante papel en la **actividad antineoplásica**, principalmente debido a su actividad antioxidante, aunque parece regular además los sistemas de detoxificación, favorece la comunicación intercelular, interfiere con las células proliferantes e inhibe la progresión del ciclo celular y modula las vías de transducción de señales (Bhuvaneswari y Nagini 2005).

Varios estudios indican una reducción del riesgo de padecer cáncer de próstata atribuido al consumo de tomate debido al efecto protector del licopeno. Se han propuesto varios mecanismos de acción entre los que se incluyen su capacidad para inhibir la proliferación

de las células cancerígenas, la alteración de la progresión del ciclo celular, la inhibición de la activación y la señalización de andrógenos, la mejora de la comunicación celular, la inhibición del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) y una actividad anti-angiogénica (Wertz, 2009; Elgass, *et al.*, 2012; Wei y Giovannucci, 2012). Otros estudios (Elgass, *et al.*, 2014) señalan que el licopeno puede influir en las propiedades de adhesión celular y la migración de células cancerígenas a dosis fácilmente alcanzables por los pacientes, ejerciendo una acción preventiva en este tipo de cáncer. Di Tomo *et al.* (2012), realizaron un estudio en células endoteliales de vena umbilical (HUVEC) procedentes de cordones umbilicales obtenidos al azar de madres sanas. Estos autores demostraron que el beta caroteno y el licopeno producen una reducción significativa en la expresión de moléculas de adhesión, siendo capaces de inactivar la respuesta inflamatoria producida por TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral-  $\alpha$ ).

La radiación ultravioleta sobre el organismo produce acumulación de radicales libres, lo que induce la oxidación de lípidos a nivel de la piel, la formación de arrugas y el envejecimiento. Debido a que el licopeno es liposoluble, se acumula en el estrato epidérmico y ayuda a la protección frente a las alteraciones producidas por la foto-oxidación. Se han realizado estudios epidemiológicos que relacionan al licopeno con la protección de la piel frente al daño de la radiación ultravioleta (Rizwan, *et al.*, 2011).

En cuanto a otros tipos de cáncer como el de mama y endometrio, el mecanismo de acción que parece ejercer el licopeno sobre la prevención de estos tipos de cáncer está basado en la inhibición de la progresión del ciclo celular asociado a una reducción de los niveles de la molécula ciclina D y la retención de la molécula p27Kip1 en la ciclina E-cdk2 (Nahum *et al.*, 2001). Los resultados del estudio presentados por Aune *et al.*, 2012 indican que la concentración de carotenoides en sangre está estrechamente asociada con una reducción del riesgo de padecer cáncer de mama. Existen también estudios que relacionan el licopeno con un efecto protector frente al cáncer de pulmón y pleura (Ito *et al.*, 2005), y el cáncer de colon (Narisawa *et al.*, 1998).

Van Breemen y Pajkovic (2008) estudiaron líneas celulares cancerosas de diferentes tejidos humanos e indicaron que el licopeno es capaz de promover la apoptosis en estas células y por lo tanto puede ejercer actividad antitumoral. También se le atribuyen funciones antiinflamatorias puesto que tanto en concentraciones bajas como fisiológicas en el suero, el licopeno es capaz de inhibir la activación de las células T a través de la modulación de la expresión del activador precoz linfocitario CD69 y la secreción de la interleucina-2 (IL-2) (Mills *et al.*, 2012).

Por todas estas razones, se recomienda la inclusión del licopeno en la dieta como estrategia para prevenir diversas enfermedades degenerativas crónicas, como el cáncer.





### 3.2. OBJETIVOS

Considerando la importancia económica de los derivados de tomate en España, su alto contenido en compuestos bioactivos como el licopeno, y teniendo en cuenta las evidencias científicas que relacionan su consumo con distintos efectos beneficiosos para la salud, los objetivos específicos de este estudio han sido:

1. Caracterización del contenido de licopeno en derivados de tomate.
2. Estudio de la estabilidad del licopeno en los derivados de tomate.
3. Estudio de las alegaciones de salud en el etiquetado relativas al licopeno, de acuerdo con el Reglamento 1924/2006 y posteriores.

Como se ha indicado anteriormente, este trabajo ha formado parte del proyecto de investigación OTRI UCM-AGRUCON (2008-2009) y se ha llevado a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, gracias a la obtención de una Beca de Colaboración MEC-UCM (2008-2009) y posterior realización del Trabajo de Fin de Master entre los años 2009 y 2010.



### 3.3. MATERIALES

Para llevar a cabo el presente estudio se han utilizado quince derivados de tomate presentes en los mercados españoles. Las muestras analizadas han correspondido a diferentes marcas comerciales. A continuación se especifican los productos analizados:

- Gazpacho andaluz (1 tipo).
- Zumo de tomate (4 tipos).
- Tomate entero pelado (1 tipo).
- Tomate triturado (2 tipos).
- Tomate frito o salsa de tomate (4 tipos, uno de ellos con verduras).
- Kétchup (3 tipos).

En la figura 3.8 se muestra una fotografía de los derivados de tomate analizados en el estudio.



**Figura 3.8. Fotografía de las muestras analizadas.**

En la tabla 3.3 que se muestra a continuación se describen las características de cada uno de los derivados de tomate, tanto el código que lo identifica como el tipo de envase y el tiempo de vida útil.

**Tabla 3.3. Derivados de tomate considerados en este estudio.**

<b>Tipo de producto</b>	<b>Código</b>	<b>Código Industrial</b>	<b>Fecha de caducidad</b>	<b>Tipo de envase</b>
<b>Zumos</b>	Z-K	C320:39	16/02/2009	Cartón
	Z-H	ZT-18:40	26/12/2008	Cristal
	Z-G	L03:59	25/04/2009	Cartón
	Z-L	L22	12/02/2010	Cristal
<b>Tomates fritos o Salsas</b>	TF-A	L05	14/11/2009	Cartón
	TF-O	LO31823:18	01/2011	Cristal
	TF-S	I73040292	03/2009	Cartón
<b>Kéetchup</b>	K-C	R18:16. L7332BP099	28/11/2008	Plástico
	K-P	LOT117816:52	03/09	Plástico
	K-H	33470919TK1	01/ 03 /09	Plástico
<b>Tomate entero pelado</b>	TP-C	L723203	31/12/2012	Lata
<b>Tomates triturados</b>	TT-C	6263	31/11/2011	Lata
	TT-I	725700	31/12/2012	Lata
<b>Salsa de tomate con verduras</b>	TF-GB	0835K	15/12/2009	Cristal
<b>Gazpacho</b>	G-DS	LB068AL 1219:37	26/05/2008	Cartón

De cada uno de estos productos se adquirieron 10 o más unidades del mismo lote de fabricación para poder estudiar el contenido inicial y las variaciones en el contenido de licopeno a lo largo de 24 meses de almacenamiento (2008 – 2009) en aquellos productos que su fecha de consumo preferente lo permitía, y durante el tiempo de vida útil en

aquellas muestras cuya fecha de caducidad era anterior a la fecha final del estudio. De acuerdo con las instrucciones indicadas en el etiquetado, todos los productos se almacenaron a temperatura ambiente (20 °C) excepto el gazpacho, que fue conservado en condiciones de refrigeración (4° C).

A lo largo de estos 24 meses de almacenamiento se realizaron un total 10 muestreos, en los casos posibles ya que algunos productos caducaron antes, analizándose todas las muestras por triplicado. A continuación se muestra el tiempo de almacenamiento transcurrido entre los distintos puntos de muestreo a los que se irá haciendo referencia a lo largo del estudio:

- Punto 0 al 3: 1 mes entre cada uno.
- Punto 3 a 4: 3 meses entre cada uno.
- Puntos 4 al 6: 4 meses entre cada uno.
- Puntos 6 a 10: cadencia variable dependiendo de la caducidad de cada muestra.



### 3.4. METODOLOGÍA

#### 3.4.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LICOPENO

Los carotenoides son compuestos lipófilos que se extraen normalmente utilizando una mezcla de solventes orgánicos como etanol, hexano, acetona, cloroformo... El licopeno es un carotenoide inestable ya que es susceptible a la degradación por la luz, el calor y el oxígeno (Lavelli y Torresani, 2011), con lo que es indispensable mantener especial cuidado a la hora de su manipulación, durante la purificación y el análisis de los alimentos para evitar su degradación.

La determinación del licopeno en alimentos se puede llevar a cabo a través de distintas metodologías pero no existe hoy en día ninguna técnica suficientemente rápida, versátil, y reproducible en matrices de alimentos complejas (Cámara y Sánchez-Mata, 2006b). Los métodos espectrofotométricos son simples, rápidos y se consideran métodos fiables para la identificación de licopeno en una mezcla, sin embargo, muestran una falta de especificidad y no son tan útiles como los métodos cromatográficos para la cuantificación. Por otro lado, los métodos cromatográficos son específicos y permiten la separación, identificación y cuantificación de carotenoides en alimentos y muestras biológicas, permitiendo distinguir las distintas estructuras de estos compuestos, incluyendo algunos mono y di- cis-isómeros (Lee y Chen 2001) pero requieren procesos de extracción largos y equipos especializados, lo que enlentece la obtención de los resultados.

Las diferencias observadas en el espectro de absorción entre el licopeno y otros carotenoides mayoritarios en alimentos tales como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno o luteína, hacen que la cuantificación de licopeno sea más sencilla, debido a que la máxima longitud de onda a 503 nm no interfiere con el análisis de otros compuestos. Los resultados de Fish *et al.* (2002) sugieren que en aquellas muestras donde el licopeno representa al menos el 70% de los carotenoides totales, la contribución de los carotenoides no licopeno a la absorbancia a 503 nm es menor al 2% en la sandía, 4% en el tomate y 6% en el pomelo rosa.



Para cuantificar el contenido de licopeno, se puede también utilizar el coeficiente de extinción molar (Zechmeister *et al.*, 1943), evitando problemas de inestabilidad y disponibilidad de estándares comerciales.

Olives *et al.* (2006) optimizaron y compararon un método de HPLC con un método espectrofotométrico estándar para la determinación de licopeno en vegetales y aunque el HPLC mostró mejor precisión y exactitud que la espectrofotometría, este último método pudo evaluar rápidamente el contenido de licopeno en diferentes alimentos de origen vegetal.

Así como la cromatografía líquida se considera una buena técnica para el análisis de carotenoides, la cromatografía de gases no es adecuada para el análisis de carotenoides dado que estos compuestos se descomponen cuando se exponen a las altas temperaturas utilizadas en esta técnica.

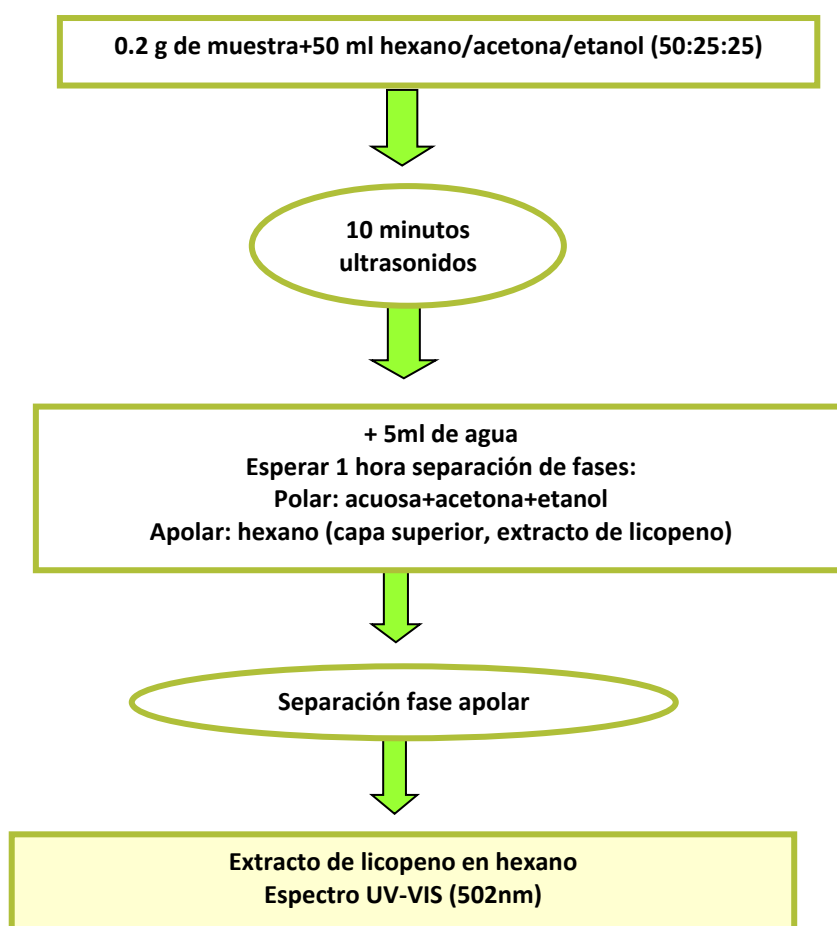
Por otra parte, el análisis del contenido de licopeno mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas acompañadas por modelos matemáticos para la interpretación de los datos, ha abierto nuevas posibilidades para evaluar y determinar la concentración de este carotenoide en productos naturales (Cámara *et al.*, 2013a).

### **OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN**

Existen distintos procesos de extracción de carotenoides siendo los de elección, como ya hemos mencionado con anterioridad, aquéllos que utilizan disolventes orgánicos. En el presente estudio, para realizar la extracción del licopeno presente en los derivados de tomate se compararon técnicas tradicionales de extracción sin aplicación de calor (agitación magnética) con técnicas más novedosas como la extracción en ultrasonidos (P Selecta Ultrasons-H) también en frío.

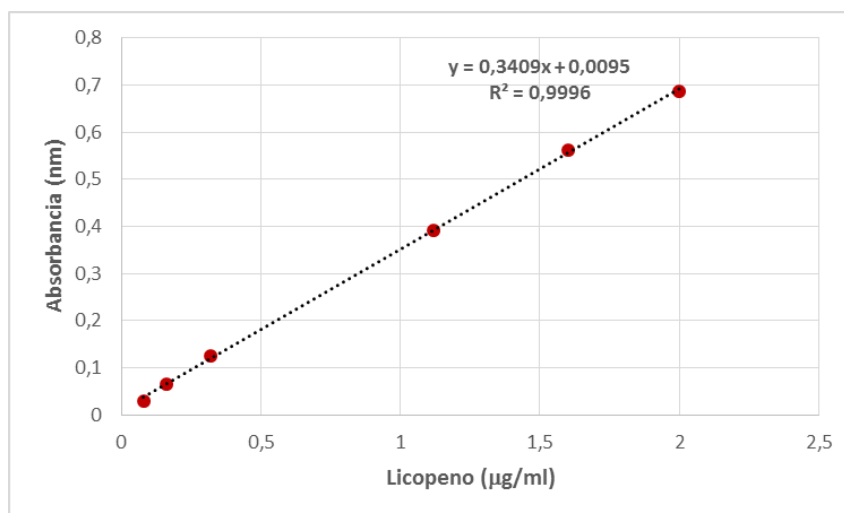
El proceso definitivo realizado es el siguiente: en primer lugar, se pesaron por triplicado 0,2 gramos de la muestra correspondiente en un frasco de cristal topacio. A continuación,

se añadieron 50 ml del disolvente compuesto por una mezcla de hexano/acetona/etanol en la proporción 50:25:25 (v/v/v). Tras esto se sometió a tratamiento de ultrasonidos durante 10 minutos para su extracción. Después, se añadieron 5 ml de agua destilada y se dejó reposar durante una hora para la separación de las fases (la polar, constituida por el agua, la acetona y el etanol, en la parte inferior, y la apolar, formada por el hexano y el extracto de licopeno, en la parte superior). La absorbancia de la fase apolar se midió en el espectrofotómetro (modelo Perkin-Elmer UV-visible Lambda EZ210) a 502 nm, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm. La adquisición de los datos y la evaluación espectrofotométrica se realizaron utilizando el software PESSW versión 1.2. En la siguiente figura 3.9 se muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo para la determinación del contenido de licopeno mediante análisis espectrofotométrico.



**Figura 3.9. Determinación del contenido de licopeno mediante espectrofotometría.**

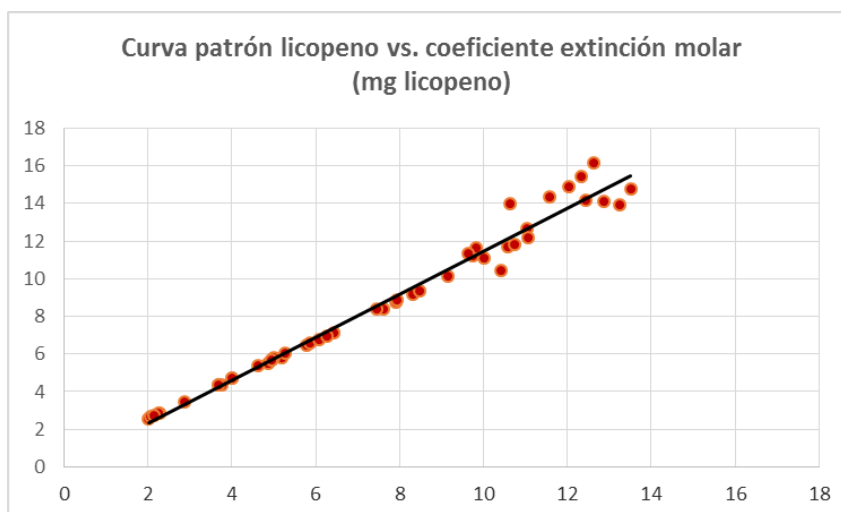
La concentración de licopeno de cada una de las muestras se calculó extrapolando los datos de absorbancia en la recta de calibrado obtenida a partir de un patrón de licopeno (Sigma) en concentraciones finales comprendidas entre 0,08 µg/ml y 2 µg/ml (figura 3.10).



**Figura 3.10. Curva de calibrado del licopeno por espectrofotometría.**

En los casos en que no es posible realizar la cuantificación del licopeno utilizando patrones certificados (debido a su coste y disponibilidad), el cálculo del mismo se puede realizar utilizando el coeficiente de extinción molar específico del licopeno en un disolvente de extracción concreto y medido a una longitud de onda concreta (Cámara y Sánchez-Mata, 2006b). Recientemente se ha demostrado la utilidad de las técnicas de espectrofotometría asociadas a modelos matemáticos para el análisis de licopeno y β-caroteno (Torrecilla *et al.*, 2008).

En nuestro caso, para valorar la idoneidad del método utilizado, hemos aplicado el método de extracción anteriormente mencionado a distintos derivados de tomate con contenidos finales de licopeno comprendidos entre 2-15 mg/100 g realizando el cálculo por los dos métodos (curva de calibrado con patrón estándar y coeficiente de extinción molar) obteniendo los resultados que se muestran de manera gráfica a continuación (figura 3.11), donde se ve claramente la buena correlación obtenida entre ambos métodos de cálculo (Zechmeister y Polgar, 1944).



**Figura 3.11. Contenido de licopeno en derivados de tomate calculado mediante curva de calibrado con patrón estándar y coeficiente de extinción molar.**

#### **VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA UTILIZADA**

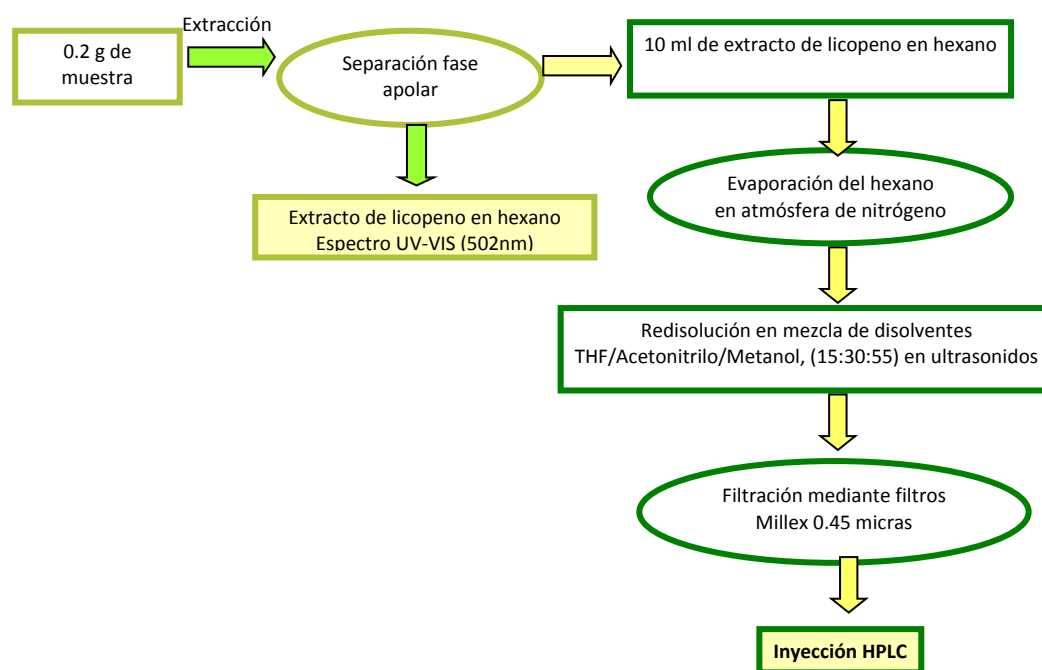
Para validar los datos obtenidos en nuestro estudio, se analizó el contenido de licopeno en diferentes derivados de tomate mediante espectrofotometría y mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La cromatografía se llevó a cabo como se describe a continuación.

Después de seguir el protocolo de extracción de licopeno de la muestra, se tomaron 10 ml de fase apolar (hexano) en matraz redondo y se evaporó en atmósfera de nitrógeno utilizando un rotavapor de nitrógeno (Büchi, Precilab S.L). El extracto se redisolvió en los siguientes reactivos calidad HPLC, tetrahidrofurano, metanol y acetonitrilo (15:55:30 v/v/v). Para asegurar que la muestra quedara bien disuelta, tras la adición de cada uno de los reactivos se sometió a tratamiento de ultrasonidos, filtrándose finalmente a través de filtros Millex N045A047A poro 0,45  $\mu\text{m}$  para su posterior inyección en el equipo de HPLC.

El equipo de cromatografía utilizado constaba de: bomba isocrática Micron Analítica, S.A PUII, sistema de inyección automático modelo Jasco AS-1555 y detector UV-visible: modelo Thermo Separation Spectra series UV100. Las condiciones cromatográficas (Olives *et al.*, 2006; Cámara *et al.*, 2010) utilizadas fueron las siguientes:

- Modelo de la columna:  $\mu$ Bondapack C18 (300 mm, 3.9 mm) en fase reversa, Waters.
- Velocidad de flujo: 0,9 ml/min.
- Fase móvil: metanol/acetonitrilo (90:10) calidad HPLC + 9  $\mu$ M TEA (elución isocrática)
- Volumen de muestra inyectado: 100  $\mu$ l. Longitud de onda: 475 nm.

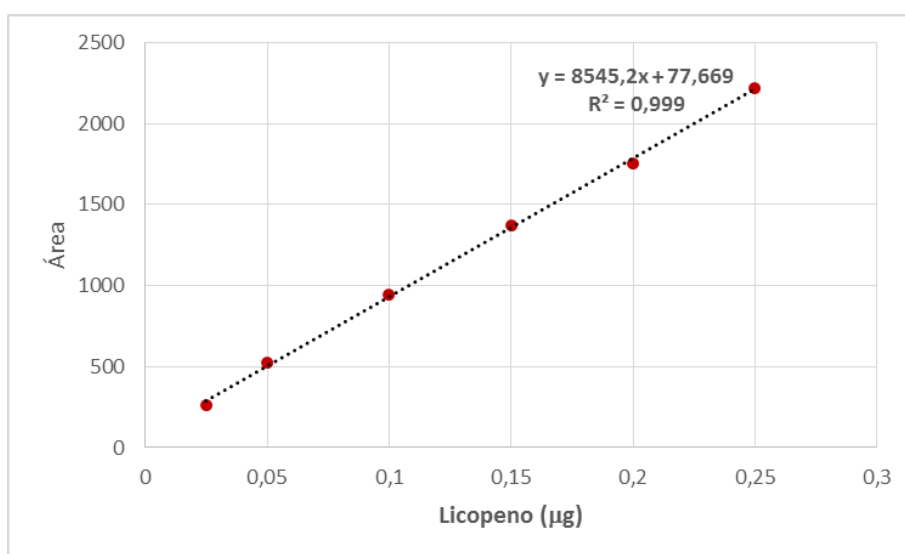
En la siguiente figura 3.12 se muestra un esquema del procedimiento realizado para la extracción y posterior análisis cromatográfico mediante HPLC.



**Figura 3.12. Determinación del contenido de licopeno mediante cromatografía líquida (HPLC) ((Olives *et al.*, 2006; Cámara *et al.*, 2010).**

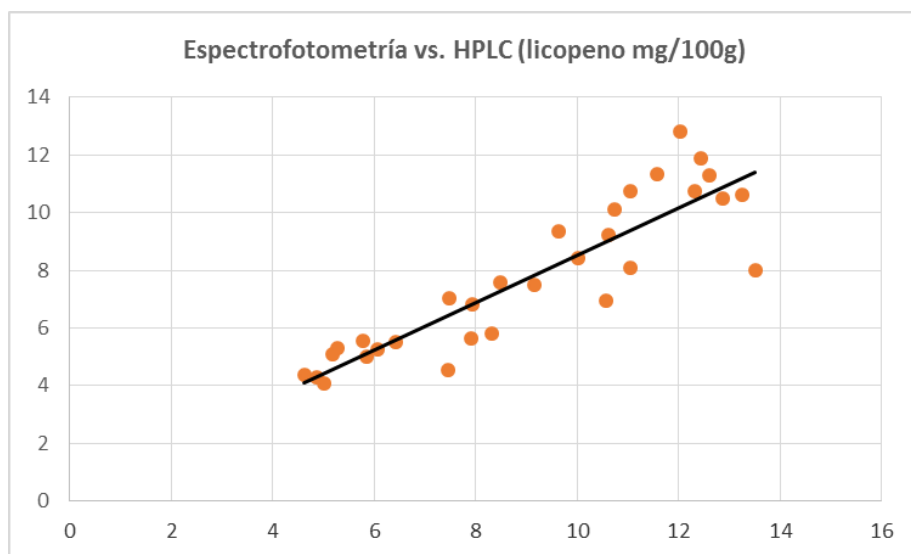
Para el procesamiento y análisis de los datos se utilizó un software Biocrom 2000 3.0 de Micron Analítica S.A.

La identificación y cuantificación del licopeno se basó en el tiempo de retención y en las áreas obtenidas de licopeno estándar (Sigma), obteniéndose la recta de calibrado (figura 3.13). Las cantidades de licopeno obtenidas estuvieron comprendidas entre 0,025 y 0,25  $\mu\text{g}$ .



**Figura 3.13. Curva de calibrado del licopeno mediante HPLC.**

Para validar la metodología seleccionada (espectrofotometría) se analizaron distintos derivados de tomate con cantidades de licopeno comprendidas entre 4,4 y 13,2 mg licopeno/100 g tanto por espectrofotometría como por HPLC-UV-Vis obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (figura 3.14).



**Figura 3.14. Comparación de los valores de licopeno obtenidos mediante espectrofotometría y HPLC.**

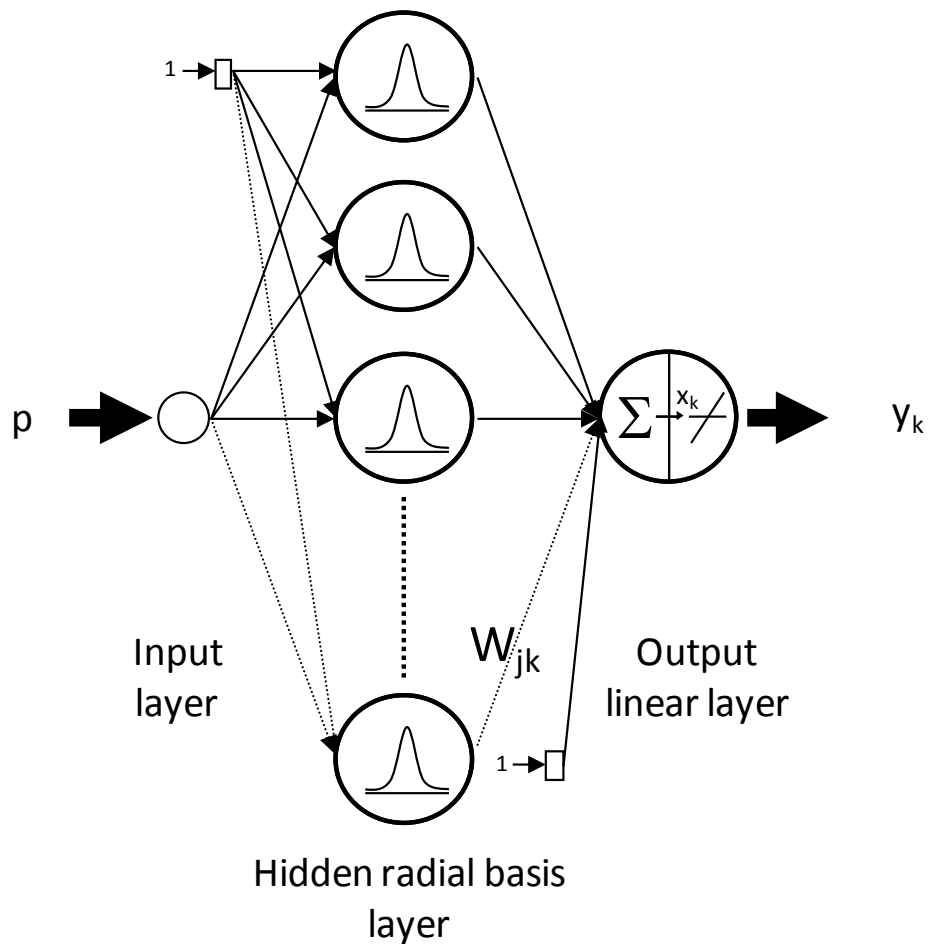
La buena correlación obtenida entre ambos métodos analíticos indica la adecuación de los resultados del contenido de licopeno analizado por la metodología propuesta.

### 3.4.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente realizando el test ANOVA y un test de rango múltiple (Test de Tukey). Si el p-valor es menor de 0,05 existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias. Para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras, se utiliza un test de rango múltiple; en este caso el que se utilizó fue el Test de Tukey, que tiene como objeto profundizar en la variabilidad de los resultados a un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico de los datos de este estudio se llevó a cabo con el programa Statgraphics plus 4.1 para Windows.

Por otra parte, se realizó una predicción del contenido y estabilidad del licopeno en los derivados de tomate mediante modelos matemáticos no lineales basados en redes neuronales (Guidance, 2007; Demuth *et al.*, 2007; Gramatica *et al.*, 2007).

El modelo aplicado, Red de Base Radial o Radial Basis Network (RBN), consiste en tres capas: entrada, base radial oculta, y salida lineal (figura 3.15). La capa de entrada no tiene ningún poder de cálculo y sirve como un distribuidor de entrada a la capa de base radial oculta. La entrada a la neurona de base radial oculta es la distancia del vector entre el peso del vector (parámetro autoajutable de la red),  $w$  y el vector de entrada,  $p$ , multiplicado por el sesgo.



**Figura 3.15.** Esquema del cálculo basado en Redes ( $\square$  nodo de sesgo) (Fernández-Ruiz et al., 2010)



Las ecuaciones matemáticas que se realizaron para llevar a cabo este modelo matemático se muestran a continuación:

$$G_j(x) = \frac{1}{e^{-x^2}} \quad (1)$$

$$y_k(x) = \sum_j^{n_h} w_{jk} \cdot G_j(x) + w_k \quad (2)$$

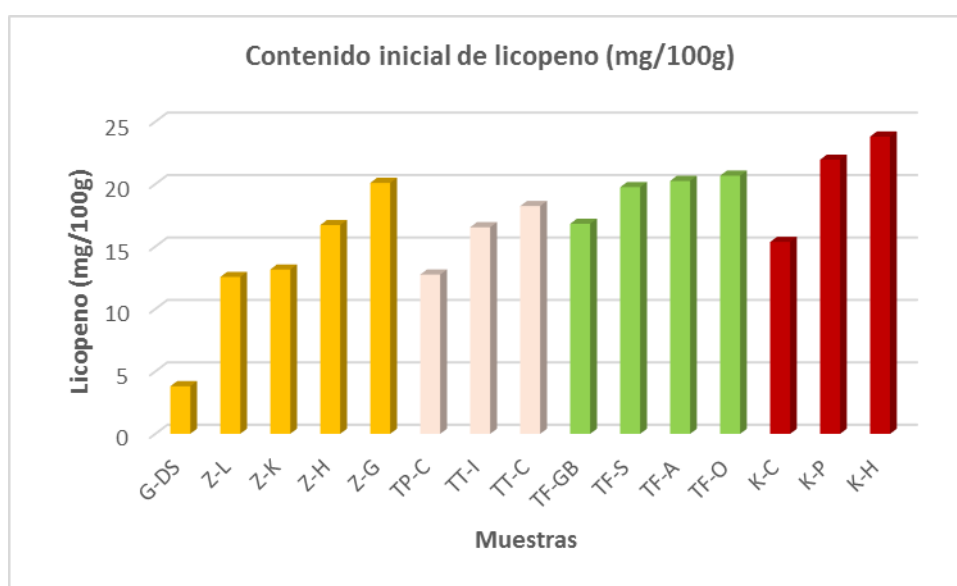
En estas ecuaciones (1 y 2),  $y_k$  (concentración de licopeno estimado) es la unidad de salida k-ésima para el vector de entrada  $x$ ,  $n_h$  es el número de neuronas de base radial oculta,  $w_{jk}$  es el peso entre la j-ésima neurona oculta y la k-ésima neurona de salida,  $G_j$  corresponde a la salida de la j-ésima neurona de base radial, y  $w_k$  es el sesgo.

Las estimaciones obtenidas deben alcanzar el menor valor de error de predicción de la media o Mean Predictor Error (MPE) y los valores más altos del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

### 3.5. RESULTADOS

#### 3.5.1 CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO INICIAL DE LICOPENO

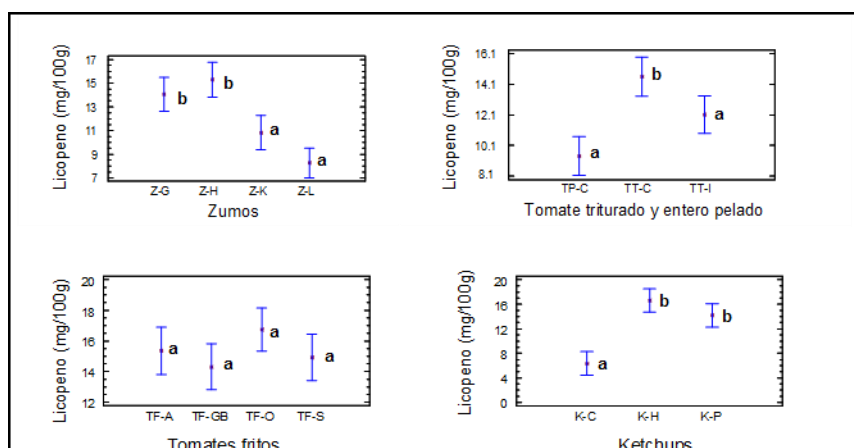
El contenido inicial de licopeno en las muestras analizadas en este trabajo es muy variable dado que los derivados de tomate son productos obtenidos por distintos procesos tecnológicos cuyas matrices son muy distintas. Los niveles más bajos de este compuesto se observan en el gazpacho, con un contenido de 3,82 mg/100 g de producto. Por el contrario, el valor más elevado corresponde al ketchup K-H con 24,60 mg/100 g, seguido del ketchup K-P y el tomate frito TF-O. Además, los valores de licopeno también varían dentro del mismo tipo de producto, observándose menos diferencias entre las distintas marcas del grupo de los tomates fritos y las mayores diferencias entre los ketchups (figura 3.16).



**Figura 3.16. Contenido de licopeno inicial en los 15 derivados de tomate analizados.**

En las gráficas que se muestran a continuación se representan las medias del contenido en licopeno obtenidas durante el estudio de todos los derivados de tomate analizados, agrupados por tipo de producto, así como el análisis de la varianza (para valorar si existen o no diferencias estadísticamente significativas) y el test de Tukey para distinguir los grupos homogéneos. Excepto en los tomates fritos, donde no hay diferencias

estadísticamente significativas, en el resto de productos (kétchups, tomates triturados, tomate entero pelado y zumos) existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) (figura 3.17).



**Figura 3.17. Gráficas de medias del licopeno.** Test de ANOVA univariante y test de Tukey (Letras diferentes significan variaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ).

Entre los distintos tipos de **zumos** analizados existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto a su contenido de licopeno, diferenciándose claramente dos grupos al aplicar el test de Tukey: zumos Z-G y Z-H con mayor contenido (ambos envasados en vidrio), y zumos Z-K (envasado en cartón) y Z-L (envasado en vidrio), este último con menor contenido de licopeno. Teniendo en cuenta estas agrupaciones y que en el caso del único zumo envasado en cartón no existen diferencias significativas con el Z-L envasado en vidrio, hace indicar que el envase no tiene una clara influencia en el contenido de licopeno.

Al estudiar la variabilidad del contenido de licopeno entre los distintos tipos de **tomates triturados y entero pelado** (todos ellos envasados en lata) se encontraron diferencias significativas entre sí ( $p < 0.05$ ) diferenciándose el tomate entero pelado TP-C y el triturado TT-I, del tomate triturado TT-C.

Al aplicar el análisis estadístico a los distintos tipos de **tomates fritos** analizados en este estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su

contenido de licopeno ( $p > 0.05$ ). TF-GB y TF-O estaban envasados en vidrio, a diferencia de TF-S y TF-A, en envase de cartón. Así, el tipo de envase, una vez más, parece no tener influencia significativa en la cantidad de este compuesto bioactivo.

En los **kétchups** (todos ellos en envase de plástico), el análisis de la varianza indica que sí existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las distintas marcas comerciales consideradas, diferenciándose claramente el kétchup K-C de los otros dos kétchups K-P y K-H.

En la bibliografía consultada se muestran resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, indicando que el contenido de licopeno en el tomate entero pelado, triturado y salsas de tomate oscila normalmente entre 6,20 y 12,71 mg/100 g, mientras el gazpacho presenta contenidos inferiores de entre 2,9 y 4,31 mg/100 g (Rao, 2006; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2012). Nuestros datos también se asemejan a los resultados de Cámara *et al.* (2003a), quienes indican que los zumos de tomate contienen entre 5,95 y 8,62 mg/100 g, mientras que los kétchups presentan un mayor contenido de licopeno entre 15,4 y 16,16 mg/100 g. Rao (2006) indica que la salsa de tomate presenta unos contenidos aproximados de 6,20 mg de licopeno/100 g y la salsa pizza de 12,71 mg de licopeno/100 g. En el presente trabajo los contenidos obtenidos son ligeramente superiores, obteniéndose cantidades de licopeno en el tomate entero pelado y triturado entre 12,72 y 18,25, en los zumos entre 12,6 y 20,1 mg/100 g, en los kétchups entre 15,4 y 24,6 mg/100 g y en las salsas se obtuvieron valores aproximados de 20 mg/100 g.

### 3.5.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL LICOPENO

Los carotenoides son pigmentos estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan, o cuando son extraídos en disolución en aceites o en disolventes orgánicos se vuelven mucho más lábiles (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). La degradación del licopeno no sólo afecta al atractivo color de los productos finales, sino también a su valor como compuesto bioactivo (Ré *et al.*, 2002). En general, el procesado que se lleva a

cabo para la obtención de los derivados de tomate aumenta el contenido de licopeno en el producto final como consecuencia de la concentración, deshidratación y calentamiento aplicados (García-Alonso *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010). Sin embargo, durante el procesado se aplican tratamientos térmicos intensos alcanzándose temperaturas de más de 100°C durante periodos de tiempo prolongados produciéndose la oxidación y degradación de los carotenoides (Jacob *et al.*, 2010).

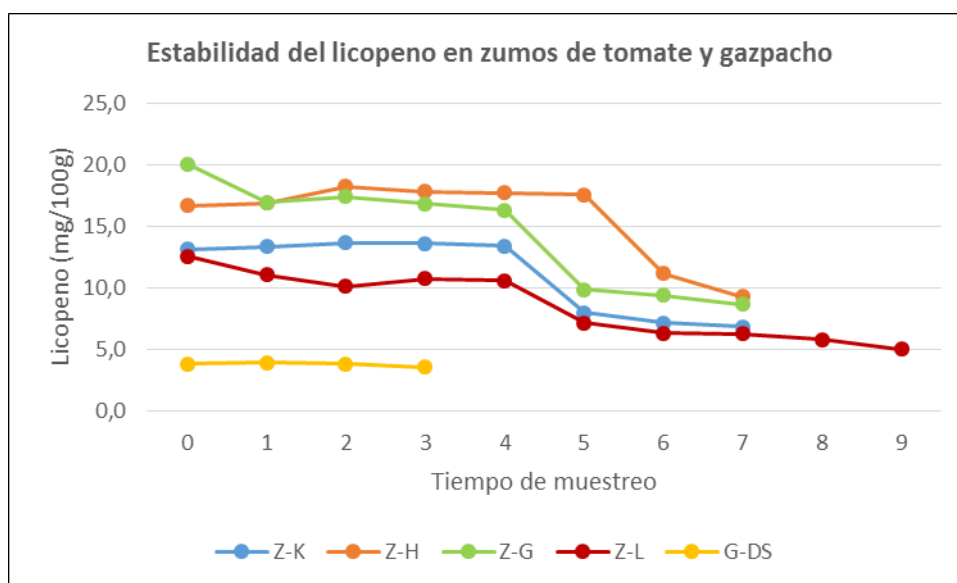
De forma general, los carotenoides son insolubles en agua y por lo tanto las pérdidas por lixiviación durante el lavado y procesamiento de los frutos son mínimas. Otros tratamientos empleados en las industrias alimentarias, como por ejemplo el tratamiento a alta presión, parece no afectar significativamente a los niveles de carotenoides en diversos productos vegetales. El escaldado industrial de los alimentos puede producir pérdidas de carotenoides, si bien la inactivación enzimática que produce previene pérdidas posteriores durante el procesado y almacenamiento. En cambio, la congelación, la adición de antioxidantes y la exclusión del oxígeno (vacío, envases impermeables al oxígeno, atmósfera inerte) disminuyen las pérdidas durante el procesado y almacenamiento de los alimentos (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

Además de la degradación oxidativa, con facilidad se lleva a cabo la isomerización *cis-trans* (Shi y Le Maguer, 2000). La autooxidación del *all-trans* licopeno y los *cis* isómeros ocurren paralelamente a la *trans-cis* isomerización, causando una división de la molécula de licopeno en fragmentos más pequeños tales como aldehídos y cetonas volátiles desarrollando sabores. En productos procesados de tomate, la isomerización y autooxidación causan una disminución del contenido de licopeno, una reducción en la proporción de licopeno *all-trans*, pérdida de color y la formación de sabores desagradables (Anguelova y Warthesen, 2000; Candelas-Cadillo *et al.*, 2005). También es importante la humedad, ya que ésta actúa como catalizador de la reacción de degradación del licopeno (Kong *et al.*, 2010).

Según los resultados de las investigaciones del Dr. Venket Rao (2006), la ingesta diaria de 7–8 mg de licopeno es suficiente para mantener los niveles de este compuesto necesarios para mostrar su capacidad antioxidante y prevenir enfermedades crónicas.

Para poder evaluar la estabilidad del licopeno en las muestras de derivados de tomate de la presente Tesis Doctoral, se ha realizado el seguimiento de este compuesto bioactivo a lo largo de un total de 24 meses (para aquellos productos que estaban en su tiempo de vida útil). Los resultados se muestran en las gráficas 3.18 y 3.19. Para cada tipo de producto se indicará cuál sería el tamaño de ración necesario para cubrir los niveles indicados anteriormente para mostrar actividad antioxidante (7-8 mg de licopeno al día), considerando que el tamaño medio de ración para los zumos es de 200-250 ml, 10 ml para los ketchup y 100 ml para las salsas.

Se observa una gran diferencia entre la cantidad inicial de licopeno (punto 0) detectada en los **zumos de tomate** y en el **gazpacho**, en el cual, el contenido es notablemente inferior. Sin embargo, al contrario que en los zumos, la estabilidad del licopeno en el gazpacho se mantiene constante a lo largo del tiempo de vida útil (figura 3.18).

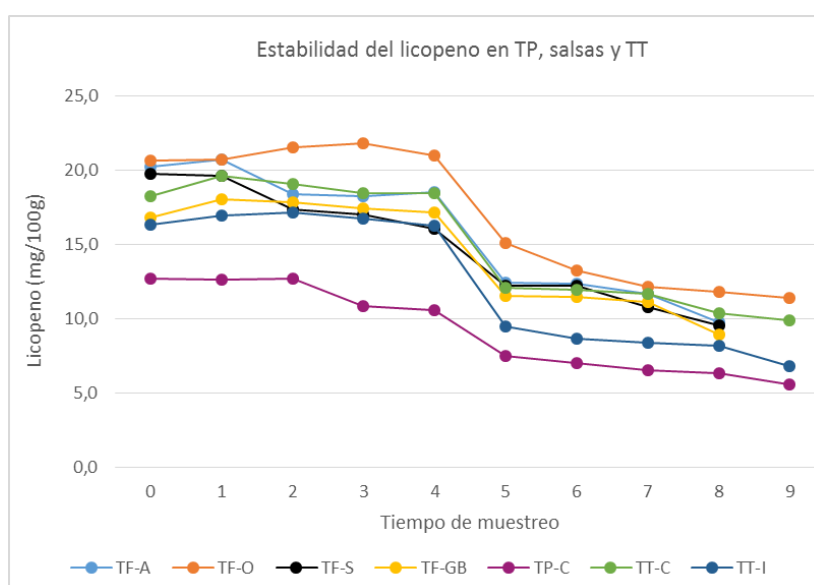


**Figura 3.18. Estabilidad del licopeno en zumos de tomate y gazpacho.**

En nuestro estudio, las cuatro muestras de zumos (Z-H, Z-G y Z-L contenidas en envase de cristal, y Z-K en envase de cartón) presentan una disminución de su contenido inicial de licopeno superior al 40%. Cabe destacar las pérdidas detectadas en las muestras de zumo de tomate Z-G y Z-L, con una disminución superior al 55% (ambas envasadas en vidrio y con mayor vida útil). En cuanto al gazpacho, como hemos indicado, la cantidad de licopeno se mantiene estable durante todo el estudio, hecho que se puede atribuir a que su tiempo de vida útil, de 3 meses, fue bastante inferior a la que presentaron los demás derivados de tomate.

El consumo de una ración (250 ml) de cualquiera de los zumos o gazpacho considerados en esta Tesis cubriría los niveles de licopeno establecidos por Rao (2006) necesarios para mostrar su capacidad antioxidante y prevenir enfermedades crónicas.

En cuanto al **tomate entero pelado**, las **salsas de tomate** y los **tomates triturados**, en la siguiente figura 3.19 se puede observar que los niveles iniciales de licopeno son sensiblemente inferiores en la muestra de tomate entero pelado TP-C que en las distintas salsas de tomate consideradas. Cabe destacar la cantidad de licopeno del TF-O, superior a la de los otros tomates triturados y salsas.



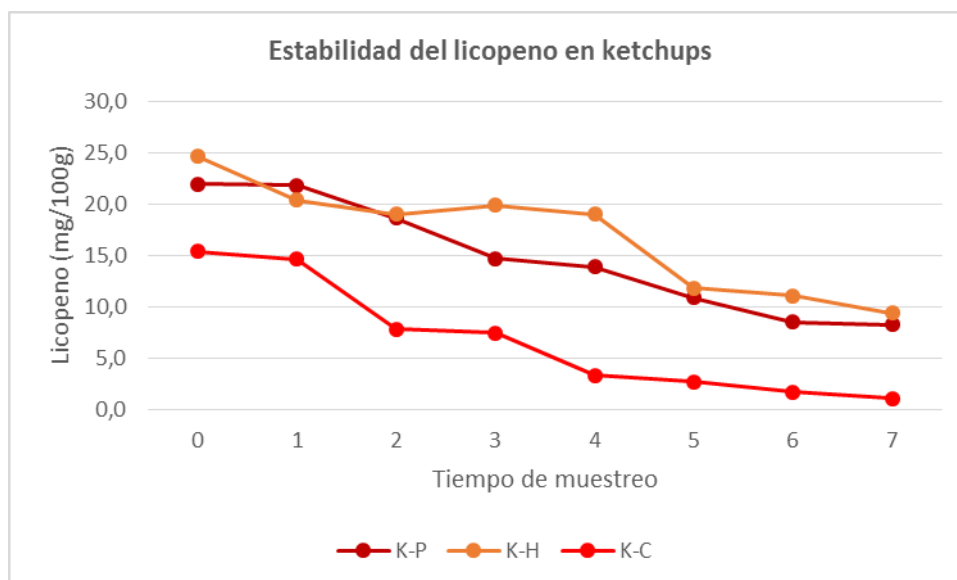
**Figura 3.19. Estabilidad del licopeno en derivados de tomate: tomate entero pelado, salsas y tomate triturado.**

Se observa una notable disminución del contenido en licopeno en todas las muestras de tomate entero pelado, triturado y salsas analizadas a partir de los 6 meses de almacenamiento (punto 4 en adelante). Estas pérdidas fueron superiores al 45% del contenido inicial de licopeno en todas las muestras, e incluso superiores al 55% en el caso del tomate entero pelado TP-C y triturado TT-I. Como ya hemos comentado, la actividad de agua es un factor que afecta de forma negativa en el almacenamiento de los productos favoreciendo la degradación de compuestos como el licopeno (Xianquan *et al.*, 2005). El tomate entero pelado y el tomate triturado presentan una gran cantidad de agua, superior a la que presentan las salsas de tomate. Este hecho puede explicar el mayor porcentaje de pérdida de licopeno en estos derivados que en las salsas de tomate consideradas.

En nuestro estudio, el consumo de 100 ml de cualquiera de las salsas estudiadas cubriría la ingesta de los niveles de licopeno recomendados por Rao (2006), sin embargo, en las muestras de tomate entero pelado y tomate triturado la ración debería incrementarse a 125-150 ml debido a la mayor pérdida de licopeno que se produce al acercarse el final de su vida útil.

Al analizar la estabilidad del licopeno en las muestras de **kétchup**, se han encontrado claras diferencias en los niveles iniciales, como ya se ha visto anteriormente, siendo la marca K-C la que contiene menor cantidad de licopeno (15,37 mg/100 g) mientras que en los kétchups K-P y K-H el contenido es mayor (20-25 mg/100 g respectivamente). El kétchup K-H es el que posee niveles de licopeno más elevados (figura 3.20).





**Figura 3.20. Estabilidad del licopeno en muestras de ketchup.**

Los tres ketchups analizados muestran una disminución significativa del contenido en licopeno durante el estudio, siendo muy elevada en el ketchup K-C (92,92%) y algo inferior en la marca K-P (62,5%) y K-H (61,92%). Todos los envases que contenían los ketchups eran de plástico, por lo que el tipo de envase no influía en la diferencia de estabilidad de licopeno observada en estas muestras.

En el proceso de elaboración de ketchups se necesita aplicar un tratamiento térmico más intenso que el que se necesita en la obtención de otros productos como el zumo. Normalmente, este tratamiento induce la isomerización del *all-trans*-licopeno a isómeros *cis*. Estos isómeros *cis* ya se ha mencionado que muestran una menor estabilidad que los isómeros presentes de forma natural *all-trans* (Kong *et al.*, 2010; Nguyen y Schwartz, 1999). Esto podría explicar que durante la vida útil de los ketchups, el licopeno tiende a degradarse más fácilmente que en otros derivados de tomate.

En el caso de los ketchups K-H y K-P sería necesaria la ingesta de 3 raciones para cubrir las necesidades diarias de licopeno, en el caso de que se trate de un producto recién comercializado, y de 7 raciones si se encuentra en el final de su vida útil. En el caso del ketchup K-C, los niveles de licopeno dejan de ser significativos (inferiores a 5 mg/100 g)

en el 5º mes de almacenamiento, con lo que a partir de este momento la ingesta habitual de 3 raciones no llegaría a cubrir los niveles de licopeno establecidos por Rao (2006).

En la tabla 3.4 se muestra el valor medio del contenido de licopeno de cada producto analizado en cada muestreo a lo largo de los 24 meses, incluyendo el porcentaje de retención de licopeno y el porcentaje de pérdida. Como punto 0 se ha considerado el momento de compra (febrero 2008) de cada producto.

**Tabla 3.4. Contenido de licopeno (mg/100 g) de los derivados de tomate analizados a lo largo del tiempo de vida útil.**

Punto de muestreo	G-DS	Z-L	Z-K	Z-H	Z-G	TP-C	TT-I	TT-C	TF-GB	TF-S	TF-A	TF-O	K-C	K-P	K-H
0	3,82	12,56	13,16	16,72	20,10	12,72	16,34	18,25	16,82	19,75	20,25	20,67	15,37	21,95	24,60
1	3,93	11,06	13,35	16,90	16,97	12,59	16,91	19,64	18,01	19,61	20,71	20,72	14,60	21,78	20,38
2	3,82	10,11	13,67	18,24	17,44	12,67	17,16	19,05	17,84	17,36	18,37	21,51	7,82	18,60	19,00
3	3,60	10,75	13,63	17,72	16,86	10,83	16,72	18,44	17,43	17,00	18,23	21,78	7,44	14,67	19,85
4		10,62	13,44	17,55	16,34	10,54	16,24	18,43	17,14	16,08	18,55	20,98	3,29	13,87	19,00
5		7,15	8,00	11,16	9,90	7,45	9,45	12,09	11,55	12,23	12,87	15,07	2,68	10,88	11,79
6		6,36	7,15	9,28	9,39	6,99	8,66	11,97	11,48	12,19	12,40	13,26	1,69	8,50	11,08
7		6,27	6,86		8,67	6,51	8,36	11,64	11,10	10,79	11,66	12,13	1,09	8,23	9,37
8		5,84				6,36	8,15	10,37	8,94	9,54	9,71	11,79			
9		5,06				5,55	6,79	9,87				11,38			
% Retención	94,36	40,26	52,15	55,52	43,14	43,65	41,54	54,07	53,17	48,32	47,96	55,04	7,08	37,5	38,08
% Pérdida	5,64	59,74	47,85	44,48	56,86	56,35	58,46	45,93	46,83	51,68	52,04	44,96	92,92	62,5	61,92

Como se puede apreciar en la tabla, la mayoría de los derivados de tomate analizados a lo largo de su tiempo de vida útil conservan una cantidad de licopeno superior al 40-50% del contenido inicial al final del estudio, a excepción de los tres ketchups, K-C, K-P y K-H (7,08, 37,5 y 38,08% respectivamente). Entre estos grupos destaca K-C por presentar al final de su vida útil las mayores pérdidas de compuesto bioactivo, con un porcentaje de retención notablemente inferior al resto de derivados, mostrando unas pérdidas que suponen el 92,92% con respecto al contenido inicial. Cabe destacar también el porcentaje de retención inferior al 45% que han presentado los zumos Z-L, Z-G, el tomate entero pelado TP-C y triturado TT-I.

Por el contrario, el licopeno ha mostrado una mayor estabilidad en la muestra de gazpacho con un porcentaje de retención del 94,36%. Esto se puede explicar como ya se ha comentado, debido a que ha sido el producto con un tiempo de vida útil menor, habiendo transcurrido sólo 3 meses (punto de muestreo 3) desde que se adquirió hasta que se finalizó el estudio. Se ha visto que la cantidad de licopeno desciende notablemente a partir de los 6 meses de almacenamiento (punto 4 en adelante), de esta forma, si comparamos el contenido de licopeno de todos los derivados de tomate en el punto de muestreo 3, momento en el que finalizó la vida útil del gazpacho, podemos observar que en la mayoría de ellos, el contenido de licopeno se mantiene estable con respecto al punto 0. Únicamente los tres ketchups pierden más del 15% del compuesto bioactivo en este punto.

En el estudio realizado por Fernández *et al.* (2007), en el que se analizó la estabilidad del licopeno de cuatro extractos obtenidos de pasta de tomate a lo largo de un periodo de cuatro semanas, el contenido de licopeno también mostró una disminución debido a las condiciones a las que fue sometido el producto como las altas temperaturas, luz, isomerización, oxidación y el efecto de la actividad del agua, con lo que, al igual que en este trabajo de investigación, se pone de manifiesto la pérdida de licopeno a lo largo del tiempo. Sin embargo, en un estudio realizado por Ordóñez *et al.* (2009), analizaron la evolución del contenido de licopeno en muestras de tomate en conserva envasadas en

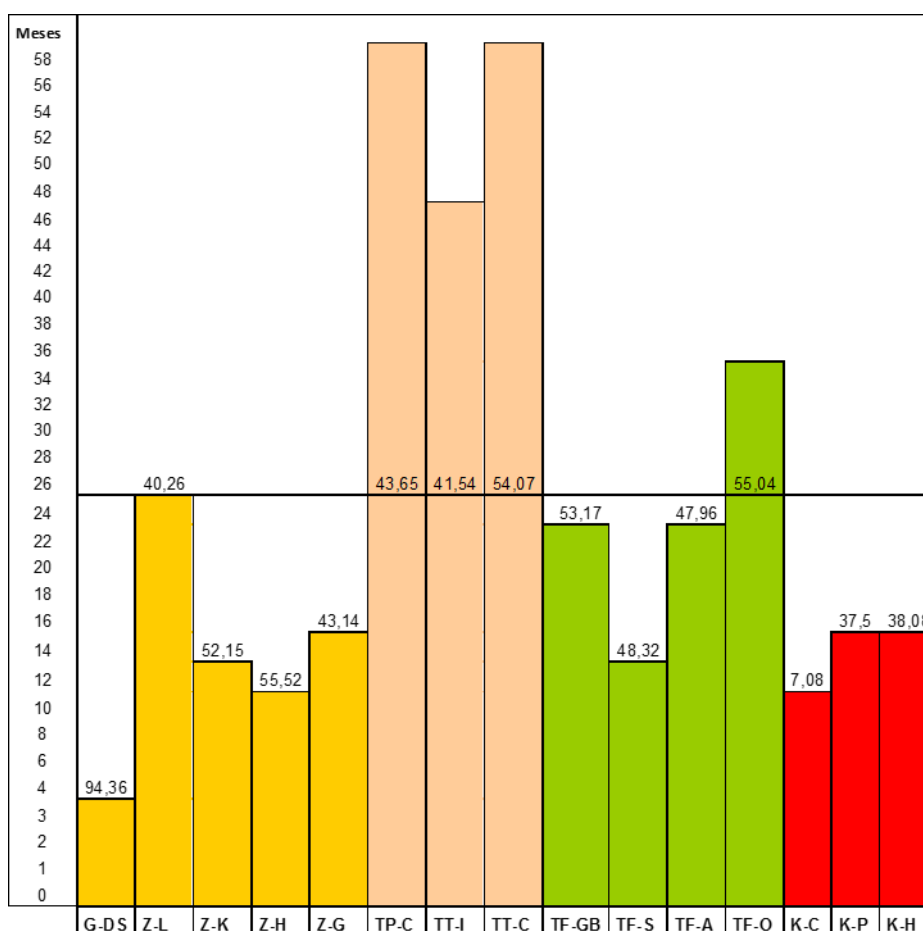
lata de hojalata y almacenadas a temperatura ambiente durante un año, no observándose modificaciones en el contenido de licopeno.

García-Alonso *et al.* (2009), evaluaron la estabilidad de los compuestos antioxidantes presentes en zumos de tomate durante un tiempo de almacenamiento de 12 meses. Las pérdidas que se detectaron al final del estudio fueron muy reducidas, menores al 20% del contenido de licopeno inicial. Esto se podría explicar debido a la presencia y estabilidad de otros antioxidantes como compuestos polifenólicos y/o por la inactivación térmica de enzimas oxidativas durante el procesado del tomate. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Bravo (2013), donde el licopeno mostró unas pérdidas que no superaron en ningún caso el 20% del total, en zumos de tomate envasados en tetrabrik y en cristal a lo largo de un periodo de almacenamiento de 12 meses. Sin embargo, Odriozola-Serrano *et al.* (2008) observaron pérdidas del 70% en zumos de tomate almacenados a 4° C durante tres meses en botellas de polipropileno. En nuestro estudio, los 4 zumos sufrieron unas pérdidas en el contenido de licopeno superiores al 30% en el punto 5 (10 meses de almacenamiento), especialmente el zumo Z-G con un contenido en ese momento del 50% con respecto al punto inicial. Otros autores como Gupta *et al.* (2010) analizaron el contenido de licopeno en zumos de tomate obtenidos mediante diferentes tratamientos y almacenados a diferentes temperaturas (4, 25, 37° C) durante un periodo de 52 semanas. Se observó que la temperatura no influyó de manera significativa en la estabilidad de este compuesto, mientras que el factor que más afectó a la degradación de licopeno fue el tiempo de almacenamiento, con un descenso de alrededor del 20% (dependiendo del tipo de procesado aplicado). En nuestro estudio todas las muestras se mantuvieron a una temperatura de 20° C, excepto el gazpacho que requería condiciones de refrigeración (4° C). De esta forma, el grado en el que la temperatura pudo influir en la degradación del licopeno fue semejante en los distintos derivados analizados (a excepción del gazpacho).

Los resultados de estabilidad del licopeno en la muestra de gazpacho obtenidos en nuestro estudio coinciden con los indicados por Vallverdú-Queralt *et al.* (2012). Estos autores evaluaron la estabilidad de los compuestos antioxidantes en muestras de

gazpachos comerciales durante un tiempo de almacenamiento de 3 meses a 4° C, obteniendo ligeras pérdidas de licopeno.

A continuación se muestra la figura 3.21 donde las barras representan el tiempo de consumo preferente (en meses) de cada uno de los productos analizados, según indicaciones en su etiquetado, junto con el porcentaje de pérdida de licopeno sufrida durante el tiempo de duración del estudio (2 años). La línea horizontal representa el final del estudio. Como punto 0 se ha considerado el momento de compra de cada producto (febrero 2008).



**Figura 3.21. Tiempo de consumo preferente (meses) de cada producto y porcentaje de retención de licopeno al final del muestreo.**

En esta figura se puede observar que los productos de mayor vida útil son el tomate entero pelado (TP-C), los dos tomates triturados (TT-I y TT-C) y el tomate frito TF-O, cuyas fechas de caducidad fueron posteriores a la fecha de fin del estudio. El porcentaje de retención en estos productos fue de entre el 40 y 50% al final del estudio, sin embargo, al ser su vida útil más larga, se podría decir que las pérdidas de licopeno serán notablemente superiores al aproximarse su fecha de caducidad.

El momento a partir del cual se produce una disminución significativa del contenido de licopeno, es, como se ha podido observar en las gráficas de estabilidad de los compuestos (figuras 3.17 a 3.19), el punto 4. A partir de este punto, el descenso es bastante acusado. Estas consideraciones son de gran interés para que la industria alimentaria pueda valorar unas recomendaciones de consumo de sus productos, indicando el periodo óptimo de consumo durante el cual, a parte de las cualidades organolépticas y nutritivas, conserven los compuestos bioactivos, como el licopeno, en cantidades suficientes para poder ejercer los beneficios sobre la salud ya comentados.

En resumen, las cantidades de los productos estudiados que habría que ingerir para cubrir las recomendaciones de Rao (2006) para mostrar su capacidad antioxidante y por lo tanto prevenir enfermedades crónicas, son las siguientes:

- Una ración de **gazpacho** de 250 ml.
- Una ración (250 ml) de cualquiera de las muestras de **zumos** considerados.
- En el caso de los **kétschups** K-H y K-P, sería necesaria la ingesta de 3 raciones de 10 ml si se trata de una muestra recién comercializada, y de 7 raciones en el final de su vida útil. En el caso de la muestra K-C, los niveles de licopeno dejan de ser significativos (inferiores a 5 mg/100g) a partir del 5º mes de almacenamiento.
- 100 ml de cualquiera de las **salsas** consideradas, sin embargo, en el tomate entero pelado y tomate triturado la ración debería incrementarse a 125-150 ml.

### 3.5.3. APLICACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA LA PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE LICOPENO EN DERIVADOS DE TOMATE

Como ya hemos comentado anteriormente, la degradación del licopeno no afecta únicamente al color final de los productos sino que también afecta a su valor funcional debido a su actividad antioxidante. Por este motivo, es importante estudiar su estabilidad y controlar su degradación en productos con una larga vida comercial como es el caso de los derivados de tomate.

El análisis y la cuantificación del licopeno en matrices alimentarias es larga y complicada, y la determinación de la estabilidad en los derivados de tomate es en particular un proceso largo en el tiempo y costoso debido a que se trata de productos que poseen en general una larga vida comercial de hasta 24 meses.

Por este motivo, en colaboración con el Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid se propuso estudiar distintos modelos matemáticos para predecir la concentración de licopeno de forma rápida y sencilla. Estudios previos del grupo demostraron que los modelos no lineales basados en redes neuronales son apropiados para la exacta determinación de la concentración de licopeno y  $\beta$ -caroteno (resolviendo los efectos de solapamiento utilizando longitudes de onda de 446 y 502 nm, respectivamente (Cámara *et al.*, 2010; Torrecilla *et al.*, 2008)). Con estos antecedentes se planteó la implementación de modelos matemáticos no lineales basados en redes neuronales (NNs) para estimar el contenido de licopeno en estos derivados de tomate evitando los métodos que implican largos periodos de calibración.

Dado que los productos analizados en la presente Tesis Doctoral representan matrices muy diferentes entre sí, el estudio de las mismas se dividió en dos partes, un primer estudio que incluía 10 muestras independientes: zumos (4 marcas diferentes), salsas de tomate (3) y ketchup (3), y un segundo estudio donde se incluyeron 5 muestras: gazpacho (1), salsa de tomate con verduras (1), tomate entero pelado (1) y tomate triturado (2 marcas diferentes). Cada uno de estos estudios fue objeto de un modelo matemático basado en redes que permitió estimar la cinética de degradación de licopeno



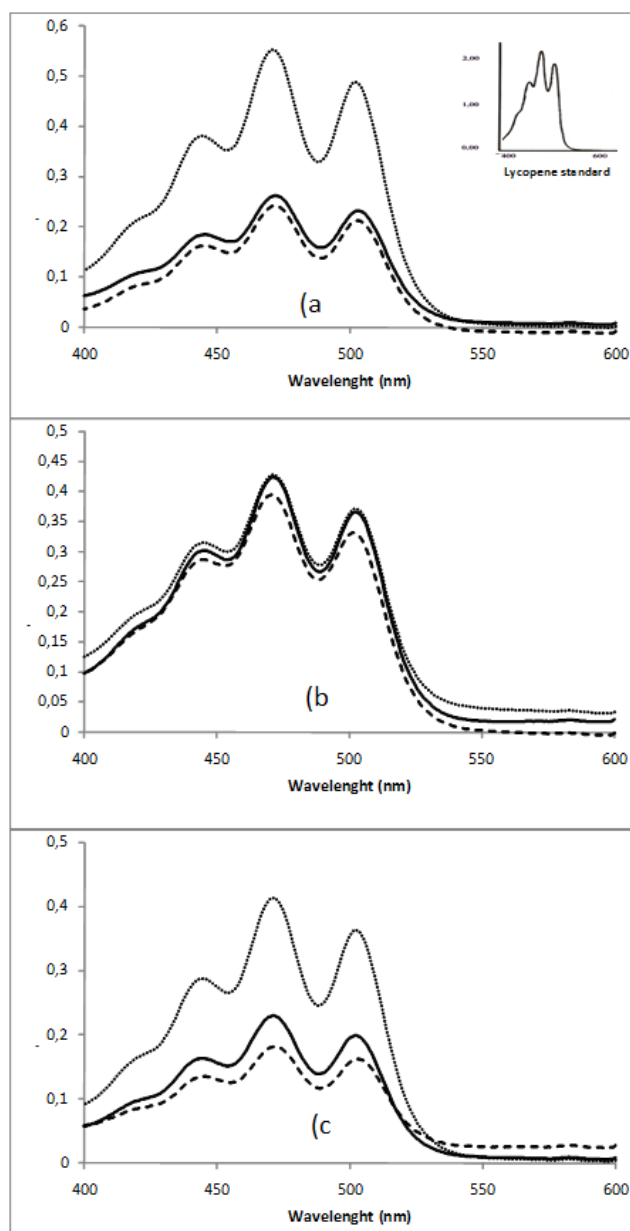
y dio lugar a tres publicaciones científicas de relevancia (Cámara *et al.*, 2012a; Fernández-Ruiz *et al.*, 2014, Cámara *et al.*, 2013b).

En todos los productos se determinó el contenido de licopeno estudiado mediante el análisis de la absorbancia por espectrofotometría, identificando los tres picos máximos de absorbancia (444, 470 y 502 nm) lo que permitió identificar el licopeno en las muestras analizadas en cada estudio.

La información a procesar consiste en un número determinado de matrices de datos en las que se incluyen el tiempo de almacenamiento de los alimentos (en semanas), sus valores de grados Brix y la concentración de licopeno.

Para la realización de este modelo RBN, el total de muestras se dividió en dos sets de datos, uno de aprendizaje (85% del conjunto de datos) para la construcción de la red, y el otro (15%) de verificación o validación externa del modelo que incluye los derivados de tomate no introducidos anteriormente en la red. Teniendo en cuenta que cada dato de la muestra de verificación debe ser interpolado dentro de la gama de aprendizaje, los datos se distribuyeron aleatoriamente entre ambas muestras.

A modo de ejemplo, en la figura 3.22 se muestran los espectros de absorción (de 400 a 600 nm) de las muestras de zumos de tomate, salsas de tomate y ketchup.



**Figura. 3.22. Perfiles de absorbancia de zumos de tomate (a) (····· 1.518  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; — 0.718  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; --- 0.656  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), salsas de tomate (b) (····· 1.157  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; — 1.138  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; --- 1.033  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y ketchups (c) (····· 1.130  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; — 0.620  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; --- 0.500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).**

A continuación se representan las tablas correspondientes al primer estudio, que incluía los ketchups, las salsas de tomate y los zumos. La tabla 3.5 incluye los datos utilizados para la construcción de la red (RBN) a partir de las muestras de ketchup y la estimación de licopeno, y en la tabla 3.6 se muestran los datos para la realización de la validación

externa utilizando algunas de las muestras de salsas y zumos de tomate, y la cantidad de licopeno estimada.

**Tabla 3.5. Estimación de licopeno a través de RBN en distintas marcas comerciales de kétchup.**

<b>Muestras</b> (kétchups)	<b>Tiempo de almacenamiento</b> (semanas)	<b>Licopeno real</b> ( $\mu\text{g/mL}^*$ )	<b>Licopeno estimado mediante RBN (<math>\mu\text{g/mL}^*</math>)</b>
K1	4	0,709	0,564
K1	12	0,278	0,274
K1	36	0,080	0,066
K1	48	0,029	0,034
K2	4	0,872	0,874
K2	12	0,571	0,577
K2	36	0,387	0,438
K2	48	0,308	0,318
K3	4	0,802	0,815
K3	24	0,757	0,758
K3	36	0,437	0,456
K3	48	0,395	0,427
<b>Media MPE</b>			<b>2,62</b>
<b>R<sup>2</sup></b>			<b>0,983</b>

\*valores de concentración de licopeno en extractos de hexano.

**Tabla 3.6. Concentración de licopeno estimado por RBN: validación externa de la red.**

<b>Muestras</b>	<b>Valores de entrada</b>		<b>Licopeno estimado</b> (mg/100 g)	<b>Licopeno real</b> (mg/100 g)
	<b>Tiempo de almacenamiento</b> (semanas)	<b>°Brix</b>		
Salsas de tomate	48	15,767	9,713	9,761
	48	13,733	11,788	11,699
	60	13,733	11,376	11,507
Zumos de tomate	64	4,700	5,835	5,809
	80	4,700	5,058	5,217
<b>Media MPE</b>			<b>1,172</b>	

Las siguientes tablas muestran los resultados del segundo grupo de derivados de tomate, compuesto por tomate entero pelado, tomates triturados, salsa de tomate con verduras y gazpacho. La tabla 3.7 incluye los datos utilizados para la construcción de la red (RBN) y la estimación de licopeno a partir de las muestras de tomate entero pelado, triturado, salsa de tomate con verduras y gazpacho, y en la tabla 3.8 se muestran los datos para la realización de la validación externa utilizando algunas de las muestras de tomate triturado, la muestra de salsa de tomate con verduras y una de tomate entero pelado, así como la cantidad de licopeno estimada.

**Tabla 3.7. Estimación de licopeno a través de RBN en distintas marcas comerciales de tomate entero pelado, tomate triturado, salsas de tomate y gazpacho.**

<b>Muestras</b>	<b>Tiempo de almacenamiento (semanas)</b>	<b>Licopeno real (<math>\mu\text{g/mL}^*</math>)</b>	<b>Licopeno estimado mediante RBN (<math>\mu\text{g/mL}^*</math>)</b>
Tomate entero pelado	36	1,067	1,064
	48	0,998	0,951
	60	0,728	0,717
Tomate triturado 1	36	1,491	1,438
	48	1,287	1,225
	60	0,983	0,948
Tomate triturado 2	36	1,536	1,618
	48	1,586	1,574
	60	1,441	1,396
Salsa de tomate con verduras	36	1,521	1,536
	48	1,611	1,567
	60	1,431	1,466
Gazpacho	8	0,643	0,638
	12	0,638	0,662
<b>Media MPE</b>			<b>2,75</b>
<b>R<sup>2</sup></b>			<b>0,988</b>

\*valores de concentración de licopeno en extractos de hexano.

**Tabla 3.8. Concentración de licopeno estimado por el modelo RBN de la validación externa de las muestras.**

Muestras	Valores de entrada		Licopeno estimado ( $\mu\text{g/mL}^*$ )	Licopeno real ( $\mu\text{g/mL}^*$ )
	Tiempo de almacenamiento (semanas)	°Brix		
Tomate triturado	50	4,7	1,193	1,117
Salsa de tomate con verduras	72	9,2	1,426	1,362
Tomate entero pelado	40	5,7	1,316	1,312
<b>Media MPE</b>				<b>3,93</b>

\*valores de concentración de licopeno en extractos de hexano.

Los resultados correspondientes a la construcción de la red y contenidos de licopeno estimados mediante RBN (tablas 3.5 y 3.7) son semejantes a los obtenidos mediante las técnicas de espectrofotometría. Esto queda reflejado en el error de predicción de la media que es muy bajo para todas las muestras, obteniéndose en el primer estudio un MPE menor de 2,62% y un  $R^2$  superior al 0,983, y en el segundo estudio un MPE menor del 2,75% y un  $R^2$  superior a 0,988, lo que indica la elevada precisión de este modelo.

En relación a la validación de la red, en el primer estudio los resultados fueron muy buenos, (media del MPE de 1,172). Sin embargo, los resultados correspondientes a la validación del segundo estudio, son mucho más variables, posiblemente influenciado por la diferente composición de las muestras consideradas (media MPE 3,93). Obteniéndose mejores resultados en aquellas muestras homogéneas en las que el tomate es el componente principal (menor presencia de otros ingredientes).

De este modo, para derivados de tomate, cuyo componente principal es el tomate, el enfoque matemático propuesto es un modelo sencillo, rápido y una herramienta fiable para determinar la concentración de licopeno y predecir su estabilidad. La información obtenida puede resultar de gran interés para los consumidores y las industrias alimentarias dado que su conocimiento es requisito imprescindible si se quiere hacer uso de las alegaciones de contenido establecidas en el Reglamento 1924/2006.

#### 3.5.4. ESTUDIO DE LAS ALEGACIONES DE SALUD DEL TOMATE Y LICOPENO

Como se mencionó anteriormente, el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, prohíbe que un alimento pueda promocionarse como poseedor de propiedades terapéuticas o curativas, y establece las siguientes categorías de declaraciones: “declaraciones nutricionales” o “de contenido”, “declaraciones de propiedades saludables” y “declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad”.

En este mismo Reglamento se especifica que se entiende por “nutriente” a las proteínas, hidratos de carbono, grasas, fibras, sodio, las vitaminas y sales minerales enumeradas en el Anexo de la Directiva 90/496/CEE y su posterior modificación en la Directiva 2008/100/CE, así como las sustancias que pertenezcan a una de estas categorías o sean componentes de una de ellas. Se entiende por “otra sustancia” una sustancia diferente de un nutriente que posea un efecto nutricional o fisiológico. Con estas consideraciones, respecto al licopeno, al no ser un nutriente, estaría incluido en la categoría de “otras sustancias” y no existía una autorización explícita de su posible uso en el etiquetado bajo la categoría de “declaraciones de propiedades saludables”. Hasta ahora, la única alegación permitida en relación al licopeno contenido en sus productos es “contiene de forma natural licopeno” o sus variaciones, siempre que el término “naturalmente” o “natural” vaya antepuesto a la declaración, no estando permitida la alegación de “fuente de licopeno”.

Después de examinar más de 44000 solicitudes de alegaciones enviadas por los distintos por los Estados miembros, la EFSA publicó en la página web de la EFSA, en mayo de 2010, la lista consolidada correspondiente a 4637 alegaciones en relación a la “función general y salud”. De éstas, la EFSA ha publicado 341 opiniones y prestado asesoría científica sobre 2758. Únicamente 222 alegaciones han conseguido hasta la fecha un dictamen positivo, de las cuales 33 hacían referencia al licopeno tanto como compuesto específico, componente de un alimento o constituyente de una mezcla en un producto comercial. Todas excepto una (artículo 14) corresponden al artículo 13, y la mayoría de ellas (12)

corresponden a solicitudes del artículo, 13.1 relacionadas con las propiedades antioxidantes del licopeno.

En cuanto a las solicitudes correspondientes al **artículo 13 (1)** estaban centradas en su mayoría en:

- La prevención del daño oxidativo sobre el ADN, proteínas y lípidos.
- La protección de la piel frente al daño oxidativo.
- El mantenimiento de la visión.

En marzo de 2011 la EFSA emitió una declaración en relación a todas aquellas propuestas relativas a las propiedades antioxidantes del licopeno incluidas en este artículo 13 (1), denegándolas en los términos en que estaban redactadas (EFSA, 2011a).

Los efectos alegados fueron "propiedades antioxidantes", "propiedades antioxidantes/protección celular y el ADN", "propiedades antioxidantes/protección del ADN", "control del estrés oxidativo", "para el sistema de protección antioxidante/protección del ADN", "mantiene la salud cardiovascular", "salud de la próstata" y "mantiene la salud de la próstata". Al no establecerse ninguna especificación, la población objetivo se entiende que es la población general. En relación a la alegación de "propiedades antioxidantes", el Panel asume que los efectos saludables alegados se refieren a la protección de ADN, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo varios tipos de radicales, se generan en los procesos bioquímicos (por ejemplo, cadena respiratoria) y como consecuencia de la exposición a factores exógenos (por ejemplo, radiación y contaminantes). Estos intermediarios reactivos pueden causar daños a moléculas tales como ADN, proteínas y lípidos, si no son interceptados por la red de antioxidantes, que incluye captadores de radicales libres. Esto significa que las propiedades antioxidantes del licopeno sólo producen un efecto fisiológico beneficioso al suponer una protección frente al daño oxidativo del ADN, proteínas o lípidos.

La EFSA consideró que el tomate y sus derivados de tomate son las principales fuentes dietéticas de licopeno, junto con otros alimentos y el licopeno sintético, recientemente autorizado en la UE como un nuevo ingrediente alimentario. Además, consideró que el

licopeno está suficientemente caracterizado y que la protección del ADN, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo puede ser un efecto fisiológico beneficioso. Sin embargo, consideró que ninguno de los estudios revisados cumple completamente con los requisitos de la EFSA para la sustentación de las alegaciones de propiedades antioxidantes del licopeno, capacidad antioxidante y el sistema de defensa antioxidante. El Panel basó la justificación del rechazo de todas las solicitudes presentadas en la consideración de que ninguno de los estudios aportados proporcionaban información relativa al efecto significativo del consumo de licopeno sobre **marcadores** fiables de daño oxidativo al ADN, lípidos o proteínas en comparación con un control. La EFSA considera que los **estudios en humanos** son fundamentales para la justificación de declaraciones de propiedades saludables. En relación a los tipos de estudios de intervención necesarios para la justificación del efecto, la población debe componerse de individuos sanos, y los estudios deben estar bien **controlados** (especificando bien el control/ placebo).

Hay que resaltar que los efectos fisiológicos del licopeno han sido objeto de estudio en un total de 1969 artículos de los que 1680 estudios se refieren a su actividad antioxidante en relación con la reducción de la incidencia de diferentes enfermedades crónicas. Por otra parte, en los últimos 5 años se han publicado 1067 estudios como publicaciones científicas de alcance internacional; y teniendo en cuenta el tipo de estudio, 186 son artículos de revisión y 189 corresponden a ensayos clínicos (los dos tipos de estudios de mayor nivel de evidencia científica).

Algunos experimentos, y estudios en humanos, generalmente de pequeña escala, investigan los efectos del consumo de licopeno en la actividad antioxidante total del plasma medido mediante varios ensayos como son, por ejemplo, la medida de la capacidad antioxidante según equivalentes de Trolox (TEAC), el potencial reactivo antioxidante total (TRAP), el ensayo de quimioluminiscencia utilizando 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) como reactivo; concentraciones de GSH y actividad antioxidante de metaloenzima; rotura de la cadena de ADN, oxidación del ADN *ex vivo* (por ejemplo, en los linfocitos), midiendo por diferentes ensayos las modificaciones del cometa (por ejemplo, después del enfrentamiento a Fe<sup>2+</sup> o peróxido de hidrógeno antes



de la electroforesis y la formación de malondialdehído (MDA), medido como tio-sustancias reactivas al ácido barbitúrico (TBARS) entre otros. Los auto-anticuerpos circulantes frente a las LDL no son marcadores directos de daño oxidativo a lípidos sino una medida indirecta de la función del sistema inmune, por lo que su asociación con el daño oxidativo de los lípidos no está justificada (EFSA, 2011a).

El método espectrofotométrico TBARS y MDA (modificación del método TBARS incluyendo HPLC) son utilizados frecuentemente para determinar el daño oxidativo de los lípidos, aunque a pesar de su uso frecuente, estos marcadores no han sido validados en el contexto de la fundamentación científica de declaraciones de propiedades saludables. Como tales, no son métodos directos de medición de daño oxidativo de los lípidos *in vivo*. El ensayo espectrofotométrico de TBARS no es específico y su falta de especificidad lo ha convertido en obsoleto.

La modificación HPLC del método TBARS que separa el aducto MDA-TBA a partir de compuestos de interferencia tiene una mejor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, y se puede utilizar como prueba de apoyo para la fundamentación científica de alegaciones de propiedades saludables relativas a la protección de los lípidos del daño oxidativo (además de las medidas de F2-isoprostanos y la oxidación de LDL *in vivo*). De manera similar, los productos primarios de oxidación de lípidos (peróxidos o hidroperóxidos), como también derivados de fosfolípidos (fosfatidilcolina-hidroperóxidos), se pueden medir por HPLC y se utilizan (como MDA analizada por HPLC) como evidencia de apoyo para el fundamento científico de las alegaciones de salud sobre la protección de los lípidos del daño oxidativo.

El Panel consideró que la evaluación de la actividad antioxidante total/potencial de plasma, y/o de la concentración de GSH, y/o de las actividades enzimáticas antioxidantes no son marcadores de daño oxidativo; que la formación de MDA medido como TBARS, así como la resistencia de la LDL a la oxidación, no son marcadores adecuados para evaluar la peroxidación lipídica; que las variantes del ensayo del cometa para medir el daño en el ADN no reflejan daño oxidativo del ADN sino rupturas independientes en las cadenas de ADN; que la resistencia *ex vivo* del ADN a la oxidación no refleja daño oxidativo del ADN *in*

vivo; y que la medición de las concentraciones de proteína tiol no es un marcador fiable del daño oxidativo a proteínas. Además, varios de los estudios en humanos presentados correspondían a ensayos de intervención no controlados con licopeno o derivados de tomate (EFSA, 2011a).

Por otra parte, el Panel consideró que las alegaciones sobre la capacidad antioxidante del licopeno presente en los alimentos se basaban en su capacidad de eliminar los radicales libres evaluado *in vitro* sobre sistemas modelo, y que la información facilitada no indica que el licopeno ejerza un efecto fisiológico beneficioso en humanos, tal como lo exige el Reglamento 1924/2006. Por ello, en la ponderación de las pruebas, el Panel consideró que ninguno de los estudios aportados proporcionan información relativa al efecto significativo del consumo de licopeno sobre marcadores fiables de daño oxidativo al ADN, lípidos o proteínas en comparación con un control, con lo que no se podían sacar conclusiones a partir de estas referencias para la fundamentación científica del efecto declarado.

De esta manera, sería necesario realizar estudios y/o medidas apropiadas para la justificación de la alegación que se proponga con las siguientes consideraciones: realizar estudios de intervención en humanos con individuos sanos; los estudios deben estar bien controlados (especificando bien el control/placebo); y utilizar los marcadores considerados válidos por la EFSA cuantificándose según la metodología analítica adecuada para esta agencia; o bien utilizar nuevos marcadores adecuadamente documentados (Cámara *et al.*, 2012b).

Respecto a las solicitudes del **artículo 13 (5)**, licopeno (función general, información sujeta a propiedad intelectual), dos solicitudes fueron rechazadas autorizándose únicamente en mayo de 2009 la solicitud presentada por Provexis Natural Products y correspondiente a: “Water-soluble tomato concentrate (WSTC I and II) and platelet aggregation”. El componente alimenticio objeto de la declaración de propiedades saludables es un concentrado de tomate soluble en agua, carente de licopeno y sin grasa desarrollado en dos formas nombradas WSTC I, jarabe completamente soluble en agua, y su derivado de bajo contenido en azúcar, WSTC II, en formato polvo. El efecto alegado es

“reducción de la agregación plaquetaria”, donde la población diana se compone de adultos sanos entre 35 y 70 años de edad. El Panel consideró que se había establecido una relación causa-efecto entre el consumo de concentrado de tomate soluble en agua y la reducción de la agregación plaquetaria en humanos. Por otra parte, considera que para lograr el efecto declarado se deben consumir diariamente 3 gramos de WSTC I ó 150 miligramos de WSTC II en hasta 250 ml de zumos de frutas, bebidas saborizadas o bebidas de yogur (EFSA, 2009a).

En relación a las solicitudes del **artículo 14** (reducción de factor de riesgo de enfermedad), únicamente se ha presentado la alegación "Previene el daño oxidativo de las lipoproteínas plasmáticas, lo que reduce la acumulación de placas en las arterias y reduce el riesgo de enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular y otras complicaciones clínicas de aterosclerosis". También fue rechazada en agosto de 2009 (EFSA, 2009b).

Con independencia de las alegaciones específicas del licopeno mencionadas anteriormente, hay que tener en cuenta que desde el 14 de diciembre de 2012, los productos alimenticios comercializados en la Unión europea y entre ellos los derivados de tomate, deben cumplir la siguiente normativa en relación a alegaciones de salud en el etiquetado: R. 1924/2006; R. 1925/2006; R. 116/2010 y R. 1169/2011. Hasta la fecha, las alegaciones de salud cuyo uso está permitido son las recogidas en el Reglamento 432/2012.

### 3.6. CONCLUSIONES PARCIALES

1. El **contenido inicial** de licopeno de las muestras analizadas en este trabajo es muy diferente en cada tipo de derivado de tomate, ya que son productos obtenidos por distintos procesos tecnológicos y sus matrices son muy distintas. Los niveles más bajos de este compuesto se observan en el gazpacho (5 mg/100 g). Las cantidades de licopeno en los zumos están comprendidas entre 12,60 y 20,10 mg/100 g, en el tomate entero pelado la cantidad es de 12,72, en las salsas se obtuvieron valores aproximados de 20 y en la salsa con verduras 16,82. Los valores más elevados corresponden a los ketchup siendo la marca K-C la que contiene menor cantidad de este compuesto (15 mg/100 g), seguidos de K-P y K-H (21,95 y 24,60 mg/100 g respectivamente). Este último es el que presenta mayor nivel de licopeno de todas las muestras analizadas en el trabajo.
2. En cuanto a la **influencia del almacenamiento** sobre el contenido de licopeno, este compuesto se mantiene constante a lo largo del tiempo de vida útil del gazpacho mostrando unas pérdidas finales de 5,64%, mientras que el resto de muestras presentan una pérdida de su contenido inicial en licopeno superior al 40%. Se observa una notable disminución del contenido en licopeno a partir de los 6 meses de almacenamiento hasta el final de la vida útil del producto en todas las muestras, destacando las elevadas pérdidas en el ketchup K-C (93%).
3. Consumiendo las cantidades de estos derivados que se describen a continuación, las ingestas diarias de licopeno recomendadas por Rao (7-8 mg) quedarían cubiertas, incluso al final de la vida útil del producto (excepto en el caso del ketchup K-C).
  - Una ración de **gazpacho** de 250 ml.
  - Una ración (250 ml) de cualquiera de las muestras de **zumos** considerados.
  - En el caso de los **ketchups** K-H y K-P, sería necesaria la ingesta de 3 raciones de 10 ml si se trata de una muestra recién comercializada, y de 7 raciones en el final de su vida útil. En el caso de la muestra K-C, los niveles de licopeno dejan de ser significativos (inferiores a 5mg/100g) a partir del 5º mes de almacenamiento.

- 100 ml de cualquiera de las **salsas** consideradas, sin embargo, en el tomate entero pelado y tomate triturado la ración debería incrementarse a 125-150 ml.
4. El **modelo matemático** no lineal Radial Basis Network (RBN) basado en redes neuronales, ha demostrado ser un método útil para estimar la cinética de degradación de licopeno de forma rápida, sencilla y veraz en distintos derivados de tomate. El error de predicción de la media ha sido muy bajo en todas las muestras, obteniéndose en el primer estudio un MPE de 2,62% y un  $R^2$  menor de 0,983, y en el segundo estudio un MPE menor del 2,75% y un  $R^2$  superior a 0,988, lo que indica la elevada precisión del método. Este modelo ofrece estimaciones más exactas en muestras homogéneas donde el tomate es el componente principal del producto, con lo que es especialmente recomendable en estos casos.
5. En cuanto a las declaraciones de propiedades, únicamente están autorizadas las **declaraciones de contenido** en los productos que contienen licopeno, permitiéndose las siguientes: “contiene de forma natural licopeno” o sus variaciones, siempre que el término “naturalmente” o “natural” vaya antepuesto a la declaración. En relación con las **declaraciones de propiedades saludables**, hasta la fecha sólo se ha autorizado una alegación relativa a los derivados de tomate correspondiente a un concentrado de tomate carente de licopeno cuyo efecto alegado es “reducción de la agregación plaquetaria”. Referente al licopeno, ninguno de los estudios revisados cumple completamente con los requisitos de la EFSA para la sustentación de las alegaciones de propiedades antioxidantes del licopeno, capacidad antioxidante y el sistema de defensa antioxidante. Sería necesario realizar estudios de intervención en humanos, bien controlados donde la población incluyera individuos sanos y se utilizaran los marcadores considerados válidos por la EFSA cuantificándose según la metodología analítica adecuada.



#### **4. ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA**

---



#### 4.1. IMPORTANCIA DEL ACEITE DE OLIVA

El olivo se encuentra entre los árboles más antiguos que se cultivan en el mundo. Hoy por hoy, se acepta que el cultivo del olivo se inició muy probablemente en Siria, Líbano, Israel, Turquía, unos 4.000 años antes de Cristo. Se desconoce la época en que se inicia el cultivo del olivo en España, aunque parece que se remonta a los fenicios o los griegos, si bien, su cultivo no logró demasiada importancia hasta la romanización (Sánchez Muniz, 2009) y no empezó a expandirse en forma de monocultivo hasta hace un par de siglos. A lo largo de los siglos XVIII y XIX el aceite obtenido, además de ser usado como alimento, se utilizaba en la elaboración de conservas, para iluminación, para producir jabón e incluso para la industria; sin embargo, a medida que avanzó el siglo XIX, el manejo del olivo se orientó progresivamente hacia la producción oleícola, mientras que disminuían los otros usos y disminuía el consumo de grasas de origen animal. Durante la segunda mitad del siglo XIX las grandes zonas productoras de Andalucía multiplicaron el consumo de aceite, que pasó a ser protagonista en la gastronomía local (Infante-Amate, 2012).

Así, el olivo ha constituido la base de la agricultura de secano de los países de la cuenca mediterránea desde hace más de mil años junto a las rotaciones de cereales, leguminosas y viñedo. Se trata de un sistema de producción basado en la excelente adaptación de la planta a las condiciones de sequía de su área de cultivo. La superficie cultivada es de más de 9 millones de hectáreas, con más de 700 millones de árboles, repartidos por diversas regiones del mundo, pero localizados en su mayor parte en la cuenca mediterránea (Arday *et al.*, 2004). España representa el 50% del área total de olivar en la Unión Europea, seguido de Italia con un 24%, Grecia con un 17% y Portugal con un 8% (EUROSTAT, 2014).

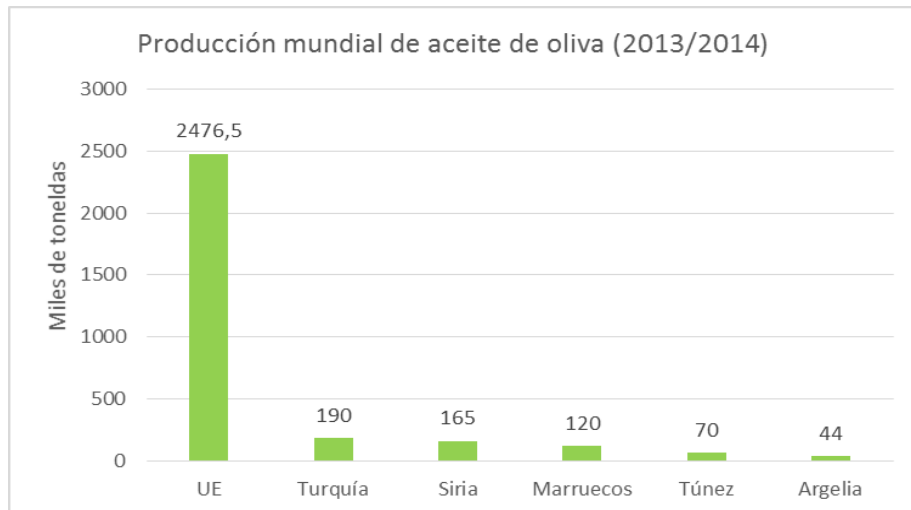
El olivo representa un importante pilar en la economía de varias regiones de España, por lo que es una gran fuente de empleo. Según datos de la Encuesta de Superficies y Rendimientos de cultivos en España, el cultivo del olivo en España ocupa unos 2,6 millones de hectáreas, lo que representa el 15% de la superficie total cultivada (ESYRCE, 2014). La distribución de olivar por Comunidades Autónomas se concentra sobre todo en



el Este, Sur y Suroeste peninsular. Destaca por su importancia Andalucía seguida por Castilla la Mancha y Extremadura.

El aceite de oliva constituye uno de los productos más importantes de la industria alimentaria en España, donde el valor de la producción del sector se sitúa en torno a 1.886 millones de euros como promedio de 2007 a 2012 (MAGRAMA, 2014). Según las cooperativas oleícolas integradas en la federación FAECA (2014), Andalucía ha registrado una producción durante la campaña 2013/2014 del 80% de toda la cosecha nacional.

Respecto a la producción total de aceite de oliva a nivel mundial en la campaña 2013/2014 fue de 3.270.500 toneladas<sup>1</sup> (t). La mayor parte de la producción se concentra en Europa, con un total de 2.476.500 t, lo que supone un porcentaje del 76% (COI, 2014). Fuera de la Unión Europea, los países con mayor producción son Turquía (190.000 t), Siria (165.000 t), Marruecos (120.000 t), Túnez (70.000 t) y Argelia (44.000 t), que juntos producen 589.000 toneladas, un 18% del total (figura 4.1).

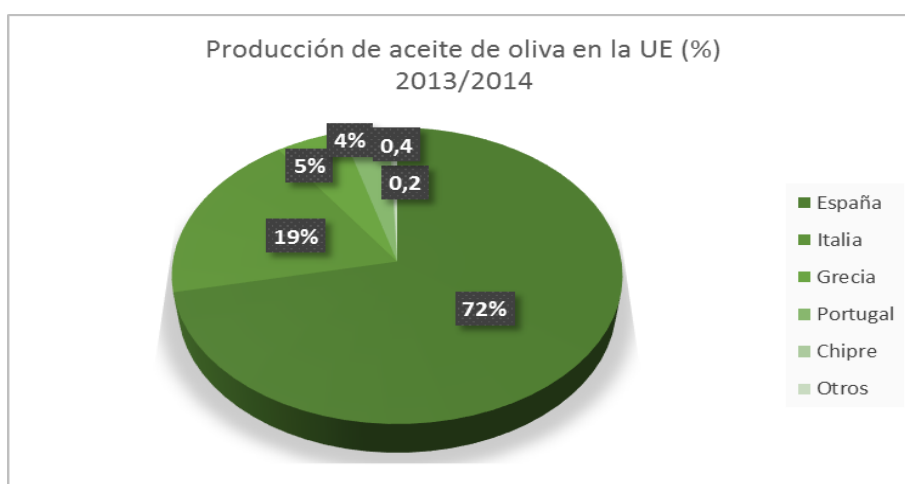


**Figura 4.1. Producción mundial de aceite de oliva (COI, 2014).**

---

<sup>1</sup> Los datos que figuran en este estudio 2 son los correspondientes a los últimos años disponibles hasta la fecha de impresión de la Tesis.

Dentro de la Unión Europea, España es el mayor productor de aceite de oliva, con una producción anual de 1.775.800 toneladas (campaña 2013/2014), lo que supone aproximadamente el 72% del total de la producción dentro de la Unión Europea y el 54% del total mundial, siendo España el mayor productor de aceite de oliva del mundo. Le siguen Italia con una producción de 461.200 toneladas (19% del total de la Unión Europea), Grecia, 131.900 toneladas (5,3%), Portugal, 91.600 toneladas (3,7%) y Chipre, 5.600 toneladas (0,23%) (figura 4.2).

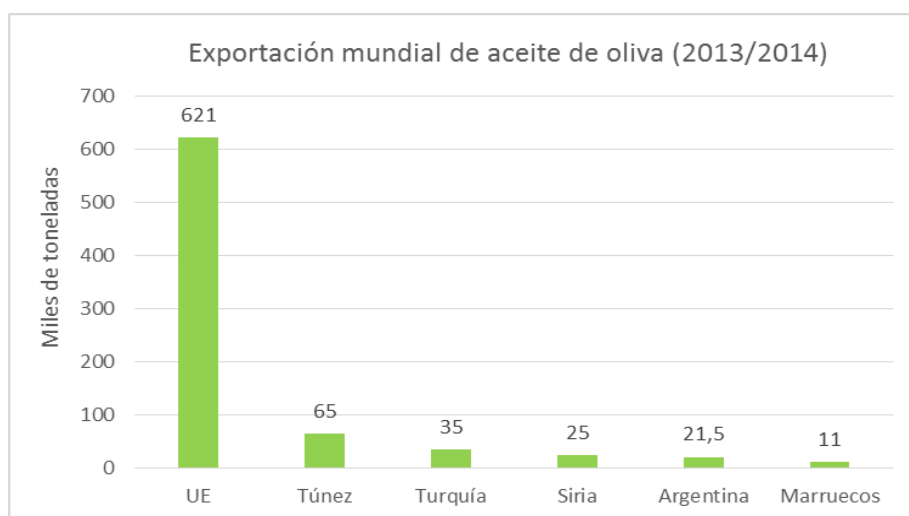


**Figura 4.2. Producción de aceite de oliva en la UE (COI, 2014).**

También es interesante señalar que la producción de aceite de oliva a nivel mundial en la campaña anterior, 2012/2013 fue de 2.401.5000 toneladas, lo que supone 869.000 toneladas menos que en la campaña 2013/2014. En el caso concreto de España, la producción ha pasado de 616.300 a 1.775.8000 toneladas (una subida del 288%). Así, la producción española ha pasado de representar el 25% del total de la producción mundial al 54% en la campaña actual. Según el director gerente de la Asociación de Exportadores de Aceituna de Mesa (Asemesa, 2014), Antonio de Mora, la campaña 2012/2013 fue "muy complicada" debido a la "elevada producción", los problemas de "falta de financiación" y la disminución del consumo y las exportaciones como consecuencia de la

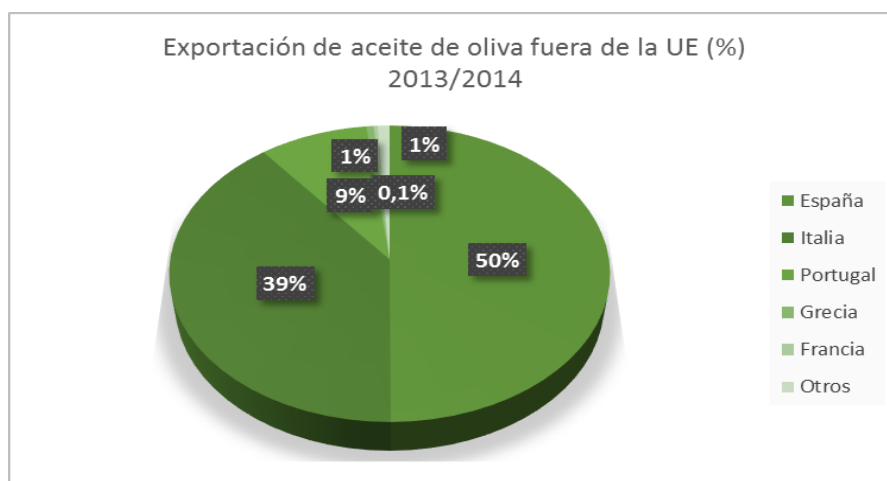
"crisis global". Sin embargo, la producción en España durante esta campaña 2013/2014 ha marcado un récord histórico, registrándose la mayor producción de los últimos años.

En lo referente a las exportaciones, el total mundial en la campaña 2013/2014 fue de 817.500 toneladas, donde la Unión Europea fue el mayor exportador de aceite de oliva (621.000 t, lo que supone el 76% del total de las exportaciones), seguido de Túnez (65.000 t, 8%), y en mucha menor proporción Turquía (35.000 t, 4%), Siria (25.000 t, 3%), Argentina (21.500 t, 2,6%) y Marruecos (11.000 t, 1,3%) (figura 4.3).



**Figura 4.3. Exportación mundial de aceite de oliva (COI, 2014).**

España es el mayor exportador de aceite de oliva a nivel mundial. Durante la campaña 2013/2014 se registraron unas cifras de exportación de 310.000 toneladas fuera de la Unión Europea, lo que significa que las exportaciones españolas suponen el 38% del total mundial y el 50% del total de la Unión Europea. El segundo país exportador es Italia que alcanza unas cifras de 245.000 t, un 30% del total mundial y el 39% de la Unión Europea.



**Figura 4.4. Exportaciones de aceite de oliva fuera de la UE (COI, 2014).**

Los principales países de destino de las exportaciones españolas de aceite de oliva son Italia, Portugal, Francia, Estados Unidos, Reino Unido, Australia, China, Japón y Brasil (ICEX, 2012).

Italia es el principal mercado del aceite de oliva español a granel, mientras que el aceite de oliva envasado es exportado principalmente a Australia, Estados Unidos, Brasil, Japón y Francia. Italia produce 461.200 toneladas, exporta 245.000 y consume 620.000. La superficie cultivable italiana es menor que la española, sin embargo, el consumo es superior y la exportación similar a la que presenta España, aunque produce menos aceite que el conjunto de lo que consume y exporta. Esto significa que para abastecer el consumo interno y externo, Italia importa aceite de otros países, sobre todo de España, con lo que una gran cantidad del aceite que se exporta desde Italia, y comercializa como italiano, realmente es aceite de oliva español.

Los principales países no pertenecientes a la Unión Europea importadores de aceite de oliva en la campaña 2013/2014 son Estados Unidos (302.500 t), Brasil (72.500 t), Japón (54.000 t), Canadá (40.500 t), China (32.000 t) y Australia (28.000 t) (COI, 2014).

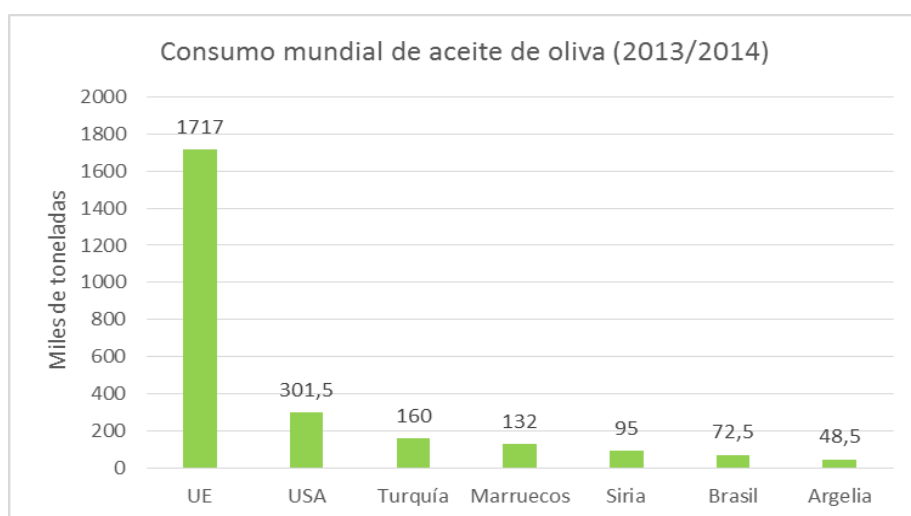
En cuanto a las importaciones en la Unión Europea, fueron Italia, con 70.000 toneladas de aceite de oliva importadas durante la campaña 2013/2014, y España, con 11.200 toneladas, los países que más cantidad de aceite de oliva importaron desde fuera de la Unión Europea. Es destacable que aunque las importaciones españolas de aceite de oliva

son muy poco relevantes y no suelen suponer más del 10% de las exportaciones, durante la campaña 2012/2013 la importación española ascendió más del 200% respecto a la campaña 2013/2014. Estas cifras registradas tan elevadas ponen de manifiesto que los envasadores españoles recurrieron de forma generalizada a las importaciones de aceite de oliva para mejorar su nivel de aprovisionamiento ante la escasa oferta de esa campaña por su pésima cosecha española por la sequía.

La mayor parte del aceite de oliva importado en España procede de la UE, siendo Portugal e Italia los principales suministradores. En cuanto a los países terceros, Túnez es el principal abastecedor, con un promedio en 6 años de 18.700 t, lo que representa el 34% sobre el total importado (COI, 2014).

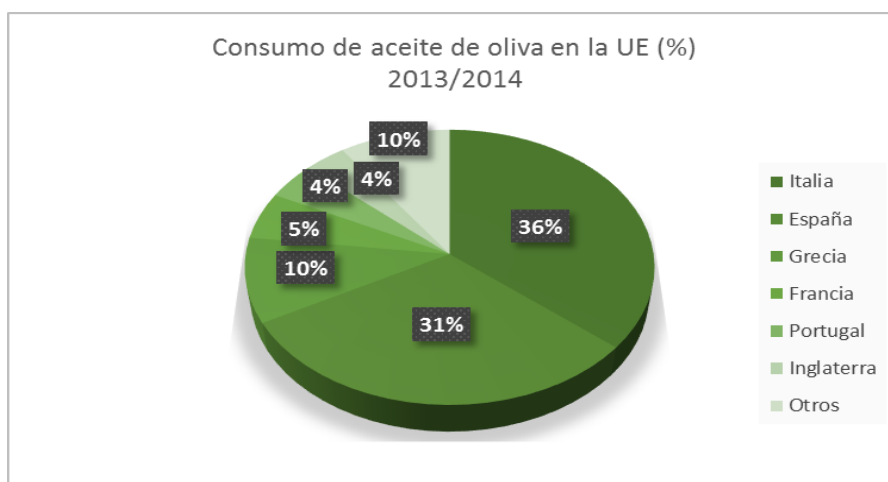
El consumo mundial de aceite de oliva registrado en la campaña 2013/2014 fue de 3.030.000 toneladas. Después de Italia y España, Estados Unidos es el tercer país con más consumo, de aceite de oliva a nivel mundial, registrando unas cifras de 301.500 t (10% del total).

Los países con mayor consumo de aceite de oliva no pertenecientes a la unión Europea, después de Estados Unidos, son Turquía (160.000 t), Siria (95.000 t), Marruecos (132.000 t), Brasil (72.500 t) y Argelia (48.500 t) (figura 4.5).



**Figura 4.5. Consumo mundial de aceite de oliva (COI, 2014).**

En la campaña 2013/2014, el consumo total de aceite de oliva dentro de la Unión Europea fue de 1.717.000 toneladas. España es el mayor productor de aceite de oliva en el mundo, aunque el país que registra un consumo más elevado de este producto es Italia, que presenta unas cifras de consumo de 620.000 t (lo que supone un 36% del total en Europa y un 20% del total mundial). A Italia le sigue España con 530.000 t (31% del total en Europa y un 18% del total mundial), Grecia con 171.000 t, Francia con 94.700 t, Portugal con 74.000 t, Inglaterra con 62.200 t y Alemania con 59.800 t (figura 4.6).



**Figura 4.6. Consumo de aceite de oliva en Europa durante la campaña 2013/2014.**  
(COI, 2014).

A lo largo de los últimos años, el consumo interior español ha representado escasamente la mitad de la producción, siendo cada vez más superado por la exportación, destino en el que los graneles acaparan una mayor proporción que los envasados.

En la siguiente figura 4.7 se representa la tendencia en cuanto a la producción, consumo y exportación de los últimos años. Una de las características más reseñables del sector del Aceite de Oliva es su fuerte y continuado crecimiento en los últimos 10 años, habiéndose multiplicado por dos la producción en ese período. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la producción de aceite de oliva en la campaña (2012/2013) muestra un notable descenso, aunque se aprecia la recuperación durante la campaña 2013/2014 tanto de la producción como de las exportaciones.

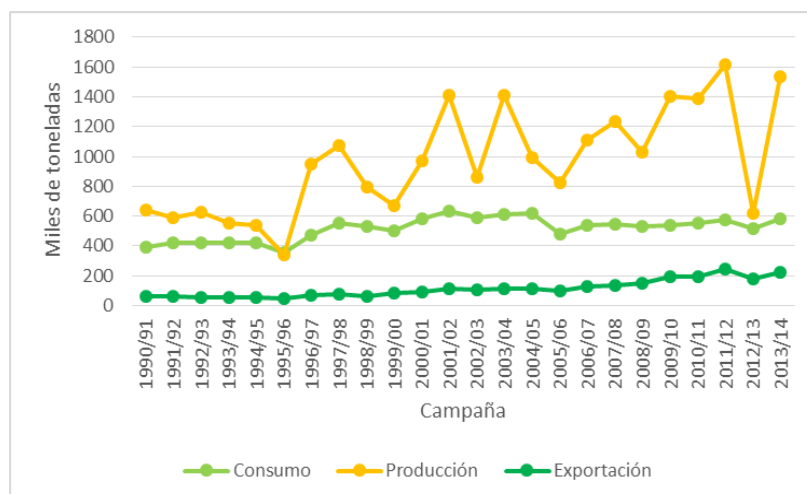


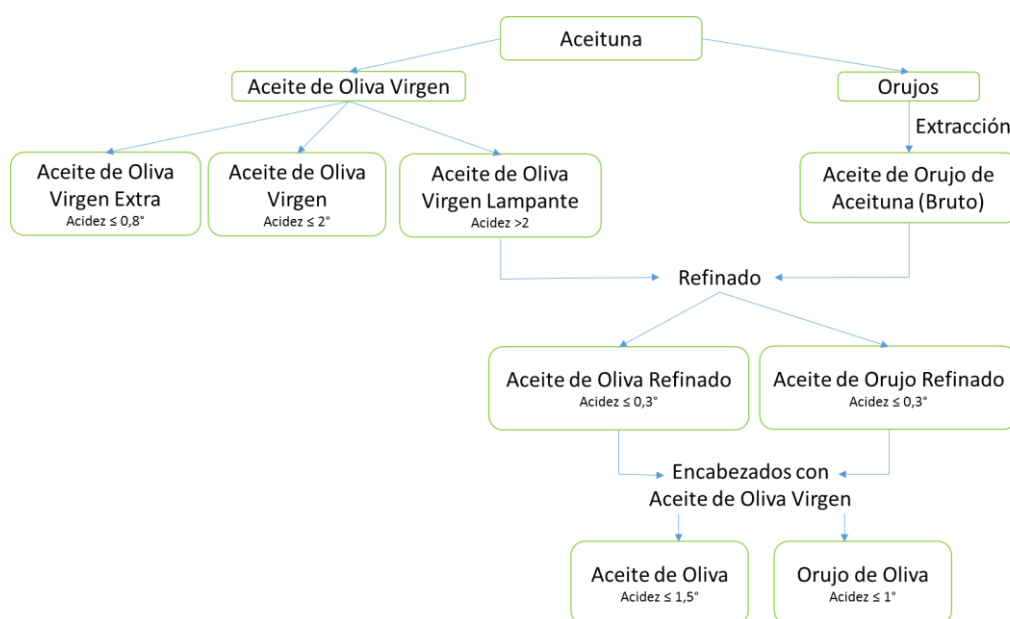
Figura 4.7. Producción, consumo y exportaciones desde 1990 a 2014 (COI, 2014).

#### 4.1.1. TIPOS DE ACEITES DE OLIVA

El aceite de oliva virgen se define como el “líquido oleoso extraído de los frutos maduros del olivo (*Olea europaea* L.), por procedimientos mecánicos, en frío, sin que haya sido sometido a otras manipulaciones que las de sedimentación, centrifugación o filtración, ni llevar mezcla de ningún aceite de otra naturaleza u obtenido de otra forma” (Reglamento 1513/2001).

En las almazaras se obtienen a partir de las aceitunas aceites de oliva virgen y orujos (figura 4.8). El orujo es la parte sólida de la pasta de aceitunas retenida durante el prensado o durante la centrifugación de masas que contiene la mayor parte de la piel, pulpa agotada y trozos de huesos, reteniendo algo de aceite (5-10%). Del aceite de oliva virgen se obtiene el aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen y aceite de oliva virgen lampante. Este último no es válido para consumo directo por su elevada acidez y debe ser refinado. Debido a que en el proceso de refinado se pierden muchos de sus compuestos minoritarios, es encabezado con aceite de oliva virgen dando lugar a un aceite que se conoce como aceite de oliva. Mediante la extracción del orujo se produce el

aceite de orujo de aceituna o aceite de orujo bruto. Este aceite es refinado produciendo un aceite de orujo refinado. A este aceite también se le encabeza con aceite de oliva virgen, originándose el aceite de orujo de oliva (Sánchez Muniz, 2009).



**Figura 4.8. Esquema de la elaboración de los distintos aceites de oliva en las almazaras (adaptado de Sánchez Muniz, 2009)**

La clasificación de las calidades comerciales del aceite de oliva se realiza de acuerdo a la normativa europea (Reglamento (CEE) 2568/91, y sus modificaciones posteriores recogidas en el Reglamento (CE) 183/93, Reglamento (CE) 865/2004, Reglamento (CE) 702/2007, Reglamento (CE) 640/2008 y el Reglamento (UE) 1348/2013 entre otros) basándose en sus propiedades físico-químicas y sus caracteres organolépticos. A continuación se definen las ya citadas categorías comerciales de aceite de oliva según el Reglamento (CE) 865/2004, de acuerdo con los parámetros de calidad más utilizados.



**Aceite de oliva virgen:**

Aceites que, habiéndose obtenido del fruto del olivo exclusivamente por medios mecánicos u otros procedimientos físicos aplicados en condiciones que excluyan toda alteración del producto, no se sujetan a ningún otro tratamiento que no sea su lavado, decantación, centrifugado o filtración, excluidos los aceites obtenidos con el uso de disolventes o de coadyuvantes de acción química o bioquímica, por un procedimiento de reesterificación o como resultado de cualquier mezcla con aceites de otros tipos.

Los aceites de oliva vírgenes sólo se clasificarán y designarán de la forma siguiente:

- a) **Aceite de oliva virgen extra.** Aceite de oliva virgen que presenta una acidez libre máxima, expresada en ácido oleico, de 0,8 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría.
- b) **Aceite de oliva virgen.** Aceite de oliva virgen que presenta una acidez libre máxima, expresada en ácido oleico, de 2 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría.
- c) **Aceite de oliva lampante.** Aceite de oliva virgen que presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de más de 2 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría.

**Aceite de oliva refinado:**

Aceite de oliva que, habiéndose obtenido del refinado de aceites de oliva vírgenes, presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0,3 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría.

**Aceite de oliva:**

Aceite de oliva que, habiéndose obtenido de una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceite de oliva virgen distinto del lampante, presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 1 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las

establecidas para esta categoría. Contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes.

**Aceite de orujo de oliva crudo:**

Aceite que se obtiene del orujo de oliva mediante un tratamiento con disolventes o empleando medios físicos, o que corresponde, salvo en determinadas características, al aceite de oliva lampante, y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría, excluido el aceite obtenido por un procedimiento de reesterificación o como resultado de una mezcla con aceites de otros tipos.

**Aceite de orujo de oliva refinado.**

Aceite que, habiéndose obtenido del refinado de aceite de orujo de oliva crudo, presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0,3 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría.

**Aceite de orujo de oliva.**

Aceite que, habiéndose obtenido de una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen distinto del lampante, presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 1 g por 100 g y cuyas otras características se ajustan a las establecidas para esta categoría.

Además de por sus propiedades físico-químicas, como ya se ha mencionado, el aceite de oliva se clasifica atendiendo a sus caracteres organolépticos. Los términos que describen los atributos positivos utilizados en la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen son los siguientes (Reglamento 640/2008; COI, 2013):

**Frutado:** conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, verdes o maduros, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

- El atributo frutado se considera **verde** cuando las sensaciones olfativas recuerdan las de los frutos verdes, características del aceite procedente de frutos verdes.
- El atributo frutado se considera **maduro** cuando las sensaciones olfativas recuerdan las de los frutos maduros, características del aceite procedente de frutos verdes y maduros.

**Amargo:** sabor elemental característico del aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero. Se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual.

**Picante:** sensación táctil de picor, característica de los aceites obtenidos al comienzo de la campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes. Puede ser percibido en toda la cavidad bucal, especialmente en la garganta.

Con estas consideraciones, y según el Reglamento 640/2008, el aceite se clasifica en función de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado. Por mediana de los defectos se entiende la mediana del defecto percibido con mayor intensidad. La mediana de los defectos y la mediana del atributo frutado se expresarán con una sola cifra decimal y el valor del coeficiente de variación sólido que los define deberá ser inferior o igual al 20 %.

*Aceite de oliva virgen extra:* la mediana de los defectos es igual a 0 y la del atributo “frutado” superior a 0.

*Aceite de oliva virgen:* la mediana de los defectos es superior a 0 e inferior o igual a 3,5 y la del atributo “frutado” superior a 0.

*Aceite de oliva lampante:* la mediana de los defectos es superior a 3,5, o bien, la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la del atributo “frutado” es igual a 0.

Del estudio realizado por el Ministerio de Agricultura, se desprende que durante el año 2013 en los hogares españoles, alrededor del 68% del consumo de aceites vegetales fue de oliva (el 27,4% fue de girasol) y se consumieron cerca de 423 mil toneladas gastándose unos 1262 millones de euros. En términos per cápita se llegó a 27,76 euros de gasto. El

consumo más notable lo representa el aceite de oliva no virgen, alcanzando el 56% (237 mil toneladas) del total del aceite de oliva seguido de un 27% de aceite de oliva virgen extra (114 mil t) y un 17% de aceite de oliva virgen (72 mil t) (MAGRAMA, 2013).

### **CALIDAD COMERCIAL Y CALIDAD DIFERENCIADA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

La **calidad comercial** del aceite de oliva virgen (AOV) está determinada por parámetros químicos como la acidez libre y el estado de oxidación (índice de peróxidos, K232, K270 y  $\Delta K$ ), que sirven para evaluar el deterioro del producto, mientras que otros marcadores analíticos, como las ceras, los esteroides, los alcoholes alifáticos y triterpénicos, los isómeros trans de los ácidos grasos, la composición de ácidos grasos y triglicéridos, el eritrodiol y uvaol y los estigmastadienos, se tienen en cuenta para prevenir las adulteraciones de los aceites y los fraudes, con lo que se consideran criterios de pureza (Reglamento 2568/91).

Los parámetros comerciales no tienen en cuenta los marcadores analíticos responsables de las propiedades saludables y algunos aspectos sensoriales del AOVE, a pesar de que éstas representan una fracción importante de la composición exclusiva del AOVE que lo diferencia de los demás aceites vegetales habituales consumidos en el mundo. Ejemplos de dichos marcadores son los compuestos antioxidantes naturales, el ácido oleico, monoinsaturado, y el escualeno. Además, estos marcadores no se indican en el etiquetado actual de los AOVE, por lo que los consumidores no están informados sobre las propiedades saludables del producto, que se deben principalmente a su alto contenido de ácido oleico, escualeno y antioxidantes naturales, como los compuestos fenólicos, tocoferoles y carotenoides (López- Miranda *et al.*, 2010; Bach-Faig *et al.*, 2011).

En términos generales, los criterios de calidad del aceite y los métodos para determinar estos parámetros analíticos han sido aprobados por el Comité Oleico Internacional (COI) y adoptados por la Unión Europea y el Codex *Alimentarius*.

Por otra parte, la Unión Europea protege las denominaciones de determinados productos específicos que están relacionados con un territorio o con un método de producción y les asigna una mención especial de calidad diferenciada con respecto al resto de los productos de la misma categoría comercial, que se traduce en los logotipos de calidad que permiten identificarlos, y que mediante controles específicos, garantizan, además, su autenticidad. Entre los sellos de **calidad diferenciada** más importantes se encuentran los de Denominación de Origen Protegida o DOP, Indicación Geográfica Protegida o IGP y Especialidad Tradicional Garantizada o ETG.

De acuerdo al Reglamento 1151/2012, se entiende por “denominación de origen” un nombre que identifica un producto originario de un lugar determinado, una región o, excepcionalmente, un país; cuya calidad o características se deben fundamental o exclusivamente a un medio geográfico particular, con los factores naturales y humanos inherentes a él, y cuyas fases de producción tengan lugar en su totalidad en la zona geográfica definida. En el caso de los aceites, sólo el aceite de oliva virgen extra podrá ser amparado bajo una denominación de origen cuando ha sido obtenido a partir de aceitunas procedentes de una determinada área geográfica, donde además se elabora y envasa.

Como se ha comentado en el plan de trabajo, este estudio 2 se ha llevado a cabo en la Universidad de Davis, California, y los procedimientos realizados han sido los descritos por la AOCS (American Oil Chemists’ Society) y no según el Reglamento europeo 2568/91, aunque como se verá más adelante, ambos procedimientos y los límites establecidos para los parámetros a determinar son casi idénticos. En la tabla 4.1 se muestran los parámetros que determinan la calidad comercial de un aceite de oliva virgen extra tanto en la legislación europea como en la estadounidense, y en la tabla 4.2 los parámetros y los límites que deben cumplir los aceites de oliva virgen extra para poder estar al amparo de una DOP, con una calidad diferenciada.

**Tabla 4.1. Criterios de calidad comercial del AOVE según legislación europea y americana.**

<b>CRITERIOS DE CALIDAD COMERCIAL</b>	<b>Europa: Reglamento 2568/91</b>	<b>EEUU: USDA (AOCS)</b>
<b>Grado de acidez</b> (% ácido oleico)	$\leq 0,8$	$\leq 0,8$
<b>Índice de Peróxidos</b> (meq de oxígeno activo por kg de aceite)	$\leq 20$	$\leq 20$
<b>Índices K</b>		
K270	$\leq 0,22$	$\leq 0,22$
$\Delta K$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
K232	$\leq 2,50$	$\leq 2,50$
<b>Valoración organoléptica</b>	Mediana de frutado > 0 Mediana de defectos = 0	Mediana de frutado > 0 Mediana de defectos = 0  Olor y flavor: excelente Color: amarillo-verde

En España, el Sector del Aceite de Oliva contó en el año 2010 con 27 Denominaciones de Origen Protegidas, siendo la producción de aceite de oliva virgen extra acogida a estas DOPs en el año 2010 de 99.988 toneladas (ICEX, 2012). En ese año, la producción de aceite de oliva en España fue de 1.498.500 t, lo que quiere decir que los aceites de oliva DOPs representan alrededor de 6,7% del total de aceite de oliva producido en España.

**Tabla 4.2. Criterios de calidad diferenciada del AOVE DOP.**

<b>CRITERIOS DE CALIDAD DIFERENCIADA</b>	<b>DOP Les Garrigues (R. 1902/2004)</b>	<b>DOP Estepa (Orden 4 de abril de 2011)</b>	<b>DOP Sierra de Segura (Orden de 4 de noviembre de 1993)</b>
<b>Grado de acidez</b> (% ácido oleico)	< 0,5	≤ 0,3	≤ 0,8
<b>Índice de Peróxidos</b> (meq de oxígeno activo por kg de aceite)	≤ 15	≤ 15-18*	< 19
<b>Índices K</b> K270	-	≤ 0,18	-
<b>Otros parámetros</b>	Humedad < 0,1%	Mediana de frutado ≥ 4,5	Humedad < 0,1% Impurezas < 0,1%

\*Valor máximo al que puede llegar en el caso de aceites de la campaña certificados que permanezcan en bodega hasta el momento del envasado.

- : no se exige un límite específico, estos aceites deben cumplir con los límites establecidos por el Reglamento 2568/91.

#### 4.1.2. ACEITE DE OLIVA Y SALUD

Los efectos beneficiosos en la salud humana atribuibles al consumo del aceite de oliva, principal aceite en la dieta mediterránea, están relacionados con su composición en nutrientes y compuestos bioactivos; concretamente con la composición en ácidos grasos, la presencia de componentes minoritarios como escualeno y fitoesteroles, y a las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos (Owen *et al.*, 2000). A raíz del estudio de Keys *et al.* (1986), se han ido realizando investigaciones médicas y nutricionales que confirman la importancia del aceite de oliva, con un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, en la reducción de la mortalidad por enfermedad cardiovascular y protección contra ciertos tipos de cáncer (Gerber, 1994).

Los nutrientes y compuestos bioactivos, que se encuentran en el aceite de oliva se pueden agrupar en dos fracciones: la fracción saponificable y la insaponificable. Dentro

de la fracción saponificable, que representa entre el 95,5 y 99,5% del total del aceite, los triglicéridos constituyen la parte más importante. El resto está compuesto principalmente por ácidos grasos libres junto con otros componentes minoritarios del aceite derivados de ácidos grasos como los monoacilglicéridos y diacilglicéridos (DAGs), fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides.

La composición de ácidos grasos del aceite de oliva varía dependiendo del cultivar, la maduración del fruto, la altitud, el clima, y otros factores. El principal ácido graso presente en el aceite de oliva es el ácido oleico (constituye entre el 55 y el 83% del aceite de oliva) seguido del ácido linoleico (3,5-21%), ácido palmítico (7,5-20%), ácido esteárico (0,5-5%) y ácido linolénico (0-1,5%) (Boskou *et al.*, 2006b). El aceite de oliva al ser rico en ácidos grasos monoinsaturados, mayoritariamente en ácido oleico, posee una mayor resistencia a la oxidación que los aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados, dado que a mayor número de dobles enlaces presentes en el aceite, más inestabilidad frente al calor, la luz y otros factores. Además, contiene  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), lo que hace del aceite de oliva, una buena fuente de ácidos grasos esenciales a la vez que protege al cuerpo de un déficit de vitamina E (Creus, 2003).

Los monoacilglicéridos y diacilglicéridos aparecen en la aceituna como consecuencia de la biosíntesis incompleta de los triacilglicéridos (TAGs) o de su hidrólisis enzimática. En general, los DAGs son más abundantes que los monoacilglicéridos. La determinación de DAGs es útil para evaluar la frescura del aceite y el momento de la cosecha del fruto debido a que el nivel de estos compuestos está íntimamente ligado a las influencias climáticas. La concentración de diacilglicéridos puede ser utilizada para determinar el origen de un aceite, incluso de un aceite refinado, debido a que el contenido de esta molécula en un aceite de oliva virgen difiere de un aceite con una elevada acidez o de aceites extraídos con disolventes (Firestone, 2005).

Dentro de la fracción no saponificable se encuentran los compuestos minoritarios como los hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos polares (Boskou *et al.*, 2006a). El color característico



del aceite de oliva se debe a pigmentos como la clorofila, feofitinas y carotenoides. La presencia de estos compuestos minoritarios también depende de factores como la madurez del fruto, el cultivar, el suelo, las condiciones climáticas y la extracción y el procesado (Boskou *et al.*, 2006b). Los compuestos minoritarios se eliminan casi totalmente durante los procesos de refinado, por lo que, en el aceite de oliva virgen, al ser obtenido únicamente mediante procesos de lavado, prensado, centrifugación y filtración, conserva todos estos componentes.

De estos compuestos minoritarios presentes en el aceite de oliva destacan los **polifenoles**. Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos bioactivos que constituyen un grupo muy heterogéneo, con más de 8000 moléculas distintas, son productos del metabolismo secundario de los vegetales y están implicados en la protección de la planta frente a los depredadores y los factores de estrés ambientales (Meskin, *et al.*, 2002). Las principales fuentes de compuestos fenólicos son frutas, vino, aceite, té y en menor proporción verduras, cereales y leguminosas.

Los compuestos fenólicos son responsables en gran parte de las características sensoriales y bioactivas con capacidad antioxidante de los vegetales y por tanto tienen importancia en la calidad de los mismos, además de estar implicados en la elevada estabilidad de este aceite en comparación con otros aceites vegetales (Bendini *et al.*, 2007).

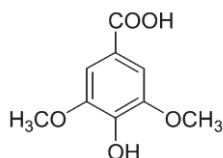
Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica como se muestra a continuación (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Clasificación y estructura química de los compuestos fenólicos más representativos del aceite de oliva (basado en Bendini *et al.*, 2007).**

**Ácidos fenólicos:**

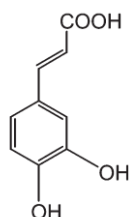
**Derivados del ácido benzoico:**

Ácido siríngico



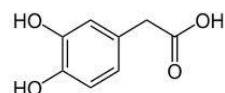
**Derivados del ácido cinámico:**

Ácido cafeico



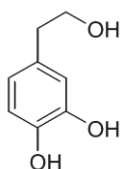
**Otros:**

Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)

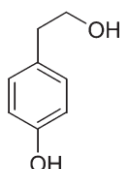


**Alcoholes fenólicos:**

Hidroxitirosol

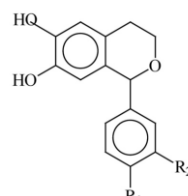


Tirosol



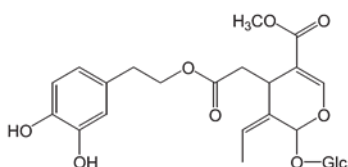
**Hidroxi-isocromanos:**

1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano

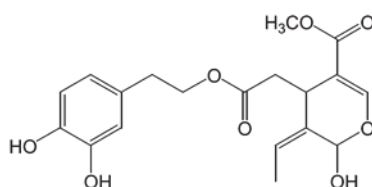


**Secoiridoides:**

Oleuropeína

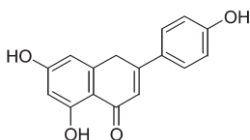


Oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA)

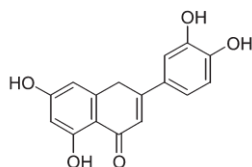


**Flavonoides:**

Apigenina

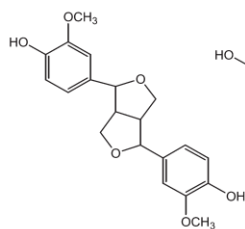


Luteolina

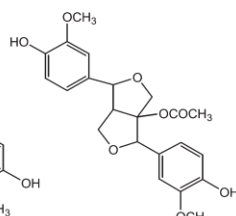


**Lignan:**

Pinoresinol



Acetoxipinoresinol



Los **ácidos fenólicos** son moléculas que poseen un solo anillo aromático en su estructura con uno o más grupos hidroxilo. Éstos se pueden dividir a su vez en ácidos benzoicos como el ácido vinílico, siríngico, gálico, y ácidos cinámicos como el cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, *o*-cumárico o el sinápico.

El grupo de **alcoholes fenólicos** está representado por hidroxitirosol (3,4-dihidroxifenil-etanol ó 3,4 DHPEA) y tirosol (*p*-hidroxifenil-etanol ó *p*-HPEA) y son los mayoritarios en el aceite de oliva virgen. Estos fenoles simples son los compuestos fenólicos más representativos en el aceite de oliva virgen extra. También es posible encontrar acetato de hidroxitirosol, acetato de tirosol y una forma glucosídica del hidroxitirosol. Existen otros alcoholes fenólicos como el ácido gálico, gentísico, vanílico, siríngico y *p*-hidroxibenzoico.

Los **secoiridoides**, como la aglicona de oleuropeína y ligstrósido y sus respectivos derivados dialdehído y decarboxilados, se caracterizan por la presencia en su molécula del ácido elenólico o de derivados del ácido elenólico (Fernández *et al.*, 1997). Los secoiridoides más abundantes en el aceite de oliva virgen son las formas dialdehído del ácido elenólico unido al hidroxitirosol (3,4 DHPEA-EDA) o al tirosol (*p*-HPEA-EDA) y un isómero de la oleuropeína aglicona (forma aldehídica del ácido elenólico unido al hidroxitirosol ó 3,4-DHPEA-EA). La oleuropeína, éster del hidroxitirosol y el glucósido del ácido elenólico, es un glucósido amargo que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco del fruto del olivo.

Otros grupos de fenoles son los lignanos como el (+)-acetoxipinoresinol, (+)-pinoresinol, y (+)-1-hidroxipinoresinol que son los lignanos mayoritarios en el aceite de oliva virgen extra (Bonoli *et al.*, 2004), los flavonoides, luteolina y apigenina (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005b), y los hidroxi-isocromanos.

Es importante resaltar que únicamente el aceite de oliva, especialmente si es virgen o virgen extra, contiene una cantidad sustancial de compuestos fenólicos. Otros tipos de aceites vegetales son pobres en estos compuestos debido a que son eliminados del aceite durante los procedimientos químicos empleados en su elaboración (Visioli *et al.*, 2006). El

aceite de oliva contiene principalmente secoiridoides (oleuropeína aglicona), fenoles simples (tirosoles e hidroxitirosoles) y lignanos.

En el transcurso de la maduración del fruto, durante el almacenamiento y durante la manipulación del fruto entre otros, se produce la hidrólisis de los secoiridoides, lo que conduce a la formación de tirosoles e hidroxitirosoles (Warleta *et al.*, 2011). En concreto, la oleuropeína se hidroliza dando lugar al hidroxitirosoles y ácido elenólico (Vissers *et al.*, 2004) como se puede apreciar en la figura 4.9.



**Figura 4.9. Hidrólisis de la oleuropeína (Boskou *et al.*, 2006a).**

Diversos factores como el origen geográfico y genético de las aceitunas, el riego, y factores tecnológicos, como las condiciones de extracción del aceite durante la molienda, la malaxación y la separación del AOVE (Servili *et al.*, 2009; Inglese *et al.*, 2011), tienen una fuerte influencia sobre la composición cualitativa y cuantitativa de las fracciones fenólicas. El grado de maduración y las condiciones de almacenamiento son otros factores que influyen en el contenido de compuestos fenólicos en un aceite. Así, el aceite elaborado con aceitunas más inmaduras contiene mayor cantidad de polifenoles que los elaborados con aceitunas más maduras. Los compuestos fenólicos se oxidan por acción de la luz, el calor y el oxígeno, con lo que el aceite almacenado en envases de acero inoxidable o botellas oscuras, y a bajas temperatura evita la degradación de estos compuestos (Méndez y Falqué 2007).

Los constituyentes fenólicos confieren un sabor amargo y pungente al aceite, como resultado de complejas interacciones entre estos compuestos y las papilas gustativas,

incluyendo la inactivación de la enzima ptialina. Un sabor ligeramente amargo y pungente son atributos positivos en el aceite de oliva. Los miembros del panel de catadores que evalúan la calidad organoléptica del aceite pueden apreciar mediante estos atributos un aceite de oliva con elevada cantidad de compuestos fenólicos (Visioli *et al.*, 2006).

Por otra parte, los compuestos fenólicos son importantes en la estabilidad del aceite. Un alto contenido total de polifenoles parece ser beneficioso para la vida útil del aceite y como ya se ha mencionado, existe una buena correlación entre estabilidad y contenido total o individual de compuestos fenólicos (Gutiérrez *et al.*, 2001). Se ha estudiado la capacidad de los fenoles del aceite de oliva, especialmente la oleuropeína y el hidroxitirosol, para eliminar los radicales sintéticos, radicales peroxilo, radicales superóxido, y ácido hipocloroso, y la capacidad para reducir los daños inducidos por el peróxido de hidrógeno (Boskou *et al.*, 2006a).

En cuanto a la biodisponibilidad, aunque una parte de los fenoles de la dieta se absorben de manera intacta, en mayor o menor proporción dependiendo de su estructura química y del resto que posee unido (azúcar por ejemplo), la mayoría son absorbidos después de ser biotransformados por la microflora del colon. Los productos mayoritarios de esta biotransformación son ácidos benzoicos, ácidos fenilacéticos y ácidos fenilpropiónicos. Muchos de estos metabolitos son absorbidos en el colon, pasan a la circulación sanguínea y son excretados por último en la orina (Williamson y Clifford 2010). Para ser excretados, los polifenoles están sujetos a procesos de detoxificación metabólica, que incluyen distintas modificaciones como metilación, sulfatación y glucuronidación. Estos procesos aumentan la hidrofiliidad del compuesto y facilitan su excreción por vía urinaria o biliar (Quiñones *et al.*, 2012). Rubió *et al.* (2012) demostraron que el acetato de hidroxitirosol es el principal metabolito del hidroxitirosol procedente de la ingestión de aceite de oliva.

Los polifenoles que muestran una mejor absorción en humanos son las isoflavonas y el ácido gálico seguido por las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina. Por el contrario, los que presentan más dificultad para ser absorbidos son las proantocianidinas y las antocianinas (Manach *et al.*, 2005).

Se ha observado que la concentración de polifenoles en el plasma es muy variable, lo que depende principalmente de su estructura química y de su fuente de origen, características que modifican su absorción y metabolismo, siendo necesario ingerir estos compuestos de forma reiterada a lo largo del tiempo para mantener concentraciones elevadas en plasma (Van het Hof *et al.*, 1999). Por otra parte, aquellos polifenoles que se encuentran en mayor cantidad en nuestra dieta no son necesariamente aquéllos que presentan una mayor biodisponibilidad (Manach *et al.*, 2004).

En cuanto a la toxicidad de los polifenoles, en todos los estudios realizados al respecto se ha excluido cualquier actividad tóxica, incluso a dosis elevadas (Babich y Visioli, 2003; Christian *et al.*, 2004).

Es de destacar que la pasta de aceituna se manguera continuamente con agua tibia durante la molienda en el proceso de malaxación, donde el agua residual resultante, que se produce en grandes cantidades, actualmente se desecha. Esta agua contiene una cantidad considerable de fenoles y se ha demostrado que los extractos de las aguas residuales tienen una potente actividad antioxidante *in vitro* (Visioli *et al.*, 1995b; Visioli *et al.*, 1999); por lo tanto, el agua residual obtenida de la molienda de aceituna se puede recuperar y emplear como una fuente barata de antioxidantes naturales.

La ingesta de polifenoles en la dieta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides (Rice-Evans y Miller, 1996; Quiñones, 2012). De los estudios realizados hasta el momento, se deduce que los compuestos fenólicos poseen distintos tipos de actividad biológica, tales como antioxidante, antihipertensiva, anticarcinogénica, laxante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antidislipémica, cardiotónica y antiplaquetaria (Ghanbari *et al.*, 2012). Además, los polifenoles o sus metabolitos parecen modular la expresión génica, la regulación epigenética, las señales celulares y la función inmune (Yun *et al.*, 2010; Bolling *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2011).

Los efectos **cardiovasculares** positivos atribuidos a los polifenoles son también consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus

acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antidislipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Los polifenoles contenidos en el aceite de oliva pueden mejorar el perfil lipídico en sangre y proteger frente al daño oxidativo. Se ha estudiado que la ingesta de compuestos fenólicos produce un cambio en la composición lipídica del plasma observándose un aumento en la concentración de lipoproteínas HDL proporcional al contenido de compuestos fenólicos de la dieta (Mangas-Cruz *et al.*, 2001), y que disminuyen los niveles de triacilglicéridos y los marcadores del estrés oxidativo (Covas *et al.*, 2006a).

Los polifenoles ejercen también un efecto sobre el **sistema inmune**. El sistema CD40/CD40L, que actúa en el proceso inflamatorio, está considerado ser proaterogénico y protrombótico. La molécula CD40, que es una proteína co-estimuladora presente en ciertas células como los linfocitos B, se une a su ligando, CD40L sobre los linfocitos T, activando a la célula. Estudios realizados por Castañer *et al.* (2012) indican que la ingesta regular de aceite de oliva rico en polifenoles está asociada a una reducción en la expresión de genes proaterogénicos y proinflamatorios relacionados con la vía CD40/CD40L.

En un estudio reciente realizado en personas sanas de edad avanzada se ha demostrado que el consumo de AOVE rico en polifenoles mejora la actividad antioxidante en el organismo ya que se ha observado un incremento en la enzima catalasa de los eritrocitos y un descenso en la superóxido dismutasa y en la actividad glutatión peroxidasa después de la ingesta de AOVE (Oliveras-López *et al.*, 2013).

Kountouri *et al.* (2007) realizaron un ensayo clínico para determinar la biodisponibilidad de los polifenoles de la aceituna y correlacionarlo con su eficacia antioxidante en voluntarios sanos que habían consumido 20 tipos de aceitunas. Se realizó un análisis de GC-MS para determinar los compuestos fenólicos individuales, una estimación del contenido de polifenoles totales en plasma y una estimación del potencial antioxidante plasmático total. Tras la intervención se observó un aumento en la cantidad de tirosol e hidroxitirosol en plasma, así como una elevación del potencial antioxidante.

La cantidad de polifenoles que llega a absorberse en el organismo no es muy elevada, por el contrario, la concentración de estos compuestos en el tracto gastrointestinal es bastante alta. De esta forma, algunos de los beneficios para la salud derivados del consumo de polifenoles debe ser atribuido a sus metabolitos bioactivos y también a la modulación de la **microbiota intestinal** (Selma *et al.*, 2009), existiendo evidencias crecientes de que muchos polifenoles favorecen el desarrollo de bacterias beneficiosas, mientras que retrasan el crecimiento de bacterias potencialmente perjudiciales en el colon (Parkar *et al.*, 2008; Tomás-Barberán y Andrés-Lacueva, 2012). Los efectos antioxidantes de los polifenoles de la dieta previenen la oxidación de las vitaminas y otros nutrientes (lípidos, proteínas, colesterol, etc.), preservando así una mayor calidad de la ingesta de nutrientes. Además, estos polifenoles pueden tener un efecto en la modulación de la actividad de las enzimas gastrointestinales tales como amilasas, lipasas y proteasas, y por lo tanto pueden inhibir la absorción de la glucosa y los ácidos grasos con los beneficios que esto conlleva en la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico (Tomás-Barberán y Andrés-Lacueva, 2012).

Parece también que los polifenoles pueden prevenir la disfunción endotelial mediante una disminución de la expresión de moléculas de adhesión, (Carluccio *et al.*, 2003), aumentando la producción de óxido nítrico (NO) e induciendo la síntesis del NO inducible (Moreno, 2003), y mediante la captación de los radicales libres intracelulares del endotelio vascular (Massaro *et al.*, 2002). Todo esto junto a un efecto antiagregante (Petroni *et al.*, 1995) puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular (Quiñones *et al.*, 2012). Se ha visto que las dietas que contienen aceite de oliva rico en polifenoles pueden disminuir la presión arterial y mejorar la función endotelial en mujeres jóvenes con una presión arterial normal-alta (Moreno-Luna *et al.*, 2012).

Como hemos comentado, existen evidencias que sugieren que el estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno está estrechamente relacionado con la carcinogénesis. Los polifenoles han sido reconocidos por tener efectos preventivos sobre el **cáncer**, principalmente debido a su actividad antioxidante aunque existen varias



consideraciones sobre el mecanismo de acción de estos compuestos como anticancerígenos, tal como fue revisado por Yang *et al.*, 2001. Por otra parte, los polifenoles pueden unirse directamente a las moléculas de señalización implicadas en la carcinogénesis y regular su actividad. La unión entre el polifenol y la proteína diana se determina por su relación estructural, lo que implica que los diferentes polifenoles tienen diferentes proteínas diana. Estudios recientes demuestran que los polifenoles pueden dirigirse directamente a las cascadas de señalización implicadas en la inflamación y el desarrollo de cáncer. La inhibición de las quinasas por los polifenoles contribuye a la atenuación de la carcinogénesis (Kang *et al.*, 2011). La actividad anticancerígena de los fenoles puede ser debida, además de a sus propiedades antioxidantes, a su capacidad de reducir la biodisponibilidad de los alimentos carcinógenos y de inhibir su activación metabólica (Stavric, 1994; Hashim *et al.*, 2005).

Dentro del grupo de los compuestos fenólicos, la oleuropeína y el hidroxitirosol se caracterizan por presentar una elevada actividad captadora de radicales libres en el ensayo del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), superior a las de otros antioxidantes utilizados en alimentación tales como las vitaminas C y E o el butilhidroxitolueno (BHT) (Visioli y Galli, 1998). Diversos estudios científicos muestran un efecto protector de la oleuropeína en el cáncer de mama así como su actividad antiinflamatoria y antimicrobiana (Bisignano *et al.*, 1999; Puel *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2007). El hidroxitirosol al poseer una marcada actividad antioxidante produce una disminución de los factores de riesgo de diversas enfermedades, como la enfermedad cardiovascular, además de poseer actividad antiinflamatoria y antimicrobiana (Salami *et al.*, 1995; Visioli *et al.*, 1995a; Baldioli *et al.*, 1996; Bisignano *et al.*, 1999; Covas *et al.*, 1999; De la Puerta *et al.*, 2000; Furneri *et al.*, 2004; Bernini *et al.*, 2013).

Cabe destacar que según los estudios de Visioli *et al.* (2003), la cantidad de hidroxitirosol excretada en orina difiere en función del vehículo en el que vaya incorporado. Se encontró que la excreción de hidroxitirosol era muy superior en el caso de utilizar AOVE como vehículo en comparación con otras matrices como un yogur bajo en grasa o un aceite de oliva refinado al que se le había adicionado este fenol. Esto quiere decir que el

hidroxitirosol es más biodisponible, y por lo tanto, podrá ejercer mayor actividad biológica, si se ingiere contenido en aceite de oliva virgen extra.

Debido a su elevada actividad antioxidante demostrada en multitud de ensayos, tanto en sistemas *in vitro* como en sistemas biológicos *in vivo* y modelos celulares, la estabilidad de los aceites de oliva a la oxidación muestra una clara correlación con el contenido de hidroxitirosol y oleuropeína de los mismos (Baldioli *et al.*, 1996). Al parecer, la estructura orto-difenólica del hidroxitirosol es fundamental para que pueda ejercer esta actividad, ya que otros compuestos similares presentes en el aceite de oliva, como el tirosol, con un solo grupo hidroxilo, tienen una actividad antioxidante menor. Además, se ha descrito que gracias también a la estructura del anillo de catecol, el hidroxitirosol puede actuar como quelante de metales (Aeschbach *et al.*, 1994; Ryan y Robards, 1998).

En modelos celulares se ha demostrado que concentraciones reducidas de hidroxitirosol pueden proteger a los eritrocitos de los daños ocasionados por el estrés oxidativo, disminuyendo de forma significativa la hemólisis y protegiendo de la lipoperoxidación de las membranas celulares eritrocitarias (Manna *et al.*, 1999). Asimismo, el hidroxitirosol mostró una reducción de la oxidación de fosfolípidos en microsomas hepáticos (Gutiérrez *et al.*, 2001), previno los daños ocasionados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en células Caco-2 intestinales (Manna *et al.*, 1997) y protegió contra el daño ocasionado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células neuronales a través de un aumento en la actividad catalasa (Hashimoto *et al.*, 2004). Además fue capaz de reducir la generación de radicales libres por leucocitos, neutrófilos y macrófagos activados (De la Puerta *et al.*, 1999; O'Dowd *et al.*, 2004). Estas propiedades antioxidantes sugieren que el hidroxitirosol podría tener cierto papel protector frente a la oxidación de las lipoproteínas LDL y contribuir de esta forma a la prevención de la enfermedad cardiovascular (Salami *et al.*, 1995; Visioli *et al.*, 1995a; Covas *et al.*, 1999).

Esta actividad captadora de los radicales libres y de protección frente a la oxidación también se ha descrito para otras macromoléculas como el ADN (Deiana *et al.*, 1999; Quiles *et al.*, 2002). Parece ser que la reducción del daño oxidativo del ADN es un posible mecanismo en la **prevención del cáncer** atribuible al consumo de AOVE rico en polifenoles, particularmente hidroxitirosol (Salvini *et al.*, 2006). Bernini *et al.* (2013)

analizaron el efecto quimiopreventivo del hidroxitirosol como resultado de su capacidad antioxidante, antiproliferativa y antiinflamatoria. Los resultados de Menéndez *et al.* (2007) indican que los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra, en concreto la oleuropeína aglicona, pueden inhibir el oncogén HER2, lo que conlleva a un efecto protector, no sólo en la prevención sino también en la progresión (invasión y metástasis) del cáncer de mama.

Estudios *in vitro* han demostrado que el hidroxitirosol es capaz de detener el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, e inducir la apoptosis de células HL60 (leucemia promielocítica) (Ragione *et al.*, 2000) y células HT29 (adenocarcinoma de colon) sin afectar a otro tipo de células no cancerosas como linfocitos aislados y células polimorfonucleares (Fabiani *et al.*, 2002). Otro estudio pone de manifiesto que el hidroxitirosol podría influenciar en la respuesta linfocitaria al inhibir su proliferación (Ragione *et al.*, 2000).

También se han descrito efectos positivos del hidroxitirosol en la prevención de la **inflamación** y la disminución de la agregación plaquetaria. Este hecho se ha demostrado preincubando células del endotelio vascular con varios compuestos antioxidantes como el hidroxitirosol, el resveratrol y la oleuropeína, experiencia que condujo a una disminución de la adhesión de monocitos al endotelio activado y a una menor producción de la molécula VCAM-1 implicada en la inflamación (Carluccio *et al.*, 2003). El estudio de Puel *et al.* (2004), indica que dietas enriquecidas en aceite de oliva virgen y oleuropeína tienen cierto efecto protector frente a la inflamación provocada en un modelo animal de ratas. Por otra parte, diversos estudios se han centrado en evaluar si el derivado secoiridoideo del hidroxitirosol p-HPEA-EDA (forma dialdehídica del ácido elenólico unido al tirosol), lo que ahora se conoce como "oleocantal", tiene propiedades antiinflamatorias con el fin de imitar los efectos farmacológicos del ibuprofeno, potente modulador de la inflamación y la analgesia. Los resultados obtenidos indican que, al igual que el ibuprofeno, los dos enantiómeros del p-HPEA-EDA produjeron una inhibición dosis dependiente de la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2 (enzimas ciclo-oxigenasa que catalizan pasos

clave en la vía de la inflamación derivada del ácido araquidónico) (Beauchamp *et al*, 2005; Smith *et al*, 2005).

La actividad antiinflamatoria del hidroxitirosol también ha sido estudiada *in vivo*. La aplicación tópica de hidroxitirosol, al igual que la de otros componentes de la fracción mayoritaria del aceite de oliva, mostró una inhibición de la inflamación, la reacción edematosa y la producción del enzima mieloperoxidasa (indicadora de la infiltración de neutrófilos al tejido inflamado) en varios modelos de inflamación de ratas (De la Puerta *et al.*, 2000).

Algunos estudios han sugerido que el hidroxitirosol y la oleuropeína poseen actividad **antimicrobiana** contra varias cepas de bacterias, agentes causales de infecciones intestinales y del tracto respiratorio en humanos (Bisignano *et al*, 1999; Waterman y Lockwood, 2007). El hidroxitirosol presenta propiedades antimicrobianas *in vitro* frente a varios agentes infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio, tales como el *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* o *Staphylococcus aureus* (Bisignano *et al.*, 1999), también posee actividad frente a *Mycoplasma pneumoniae*, agente causante de neumonía, y otras especies de la familia de los micoplasmas (Furneri *et al.*, 2004).

Con todo lo anteriormente descrito, podemos indicar que el consumo de aceite de oliva virgen está íntimamente relacionado con la disminución del riesgo de padecer ciertas enfermedades tan presentes hoy en día en las sociedades desarrolladas como la enfermedad cardiovascular y el cáncer. Esta acción beneficiosa está relacionada como hemos visto con su composición en nutrientes, en concreto de los ácidos grasos monoinsaturados y los compuestos bioactivos, especialmente los compuestos fenólicos.



## 4.2. OBJETIVOS

Dada la importancia económica del aceite de oliva en España y considerando las evidencias científicas que relacionan su consumo con distintos efectos beneficiosos para la salud, los objetivos específicos de este estudio han sido:

1. Determinación de los principales parámetros químicos de calidad comercial y calidad diferenciada en muestras de aceite de oliva virgen extra (AOVE).
2. Evaluación de otros parámetros de calidad de los aceites de oliva virgen extra: contenido de diacilglicéridos y polifenoles totales.
3. Estudio de las alegaciones de salud en relación al aceite de oliva y sus compuestos bioactivos.

Estas determinaciones se realizaron en el Departamento Food Science and Technology de la Universidad de California (Davis) en Estados Unidos durante el curso 2010-2011 gracias a una Beca de Intercambio Académico UCM-Universidad de California (Education Abroad Program Exchange Scholarship), realizándose los ensayos en el laboratorio del Dr. Charles Shoemaker.



### 4.3. MATERIALES

En España se cultivan más de 260 variedades de aceituna, muchas de las cuales están confinadas a un área geográfica limitada (ASOLIVA, 2014). La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de seis aceites de oliva virgen extra procedentes de las variedades Arbequina, Hojiblanca y Picual. Se han analizado dos muestras de cada una de estas tres variedades, una de ellas con denominación de origen protegida (DOP) y otra sin certificación de calidad diferenciada. A continuación se describen las características de las variedades estudiadas.

**Arbequina:** es la variedad más representativa de Cataluña. Es originaria de la localidad de Arbeca (Lérida), de donde toma su nombre. El árbol es muy poco ramificado, sus brotes son largos y la hoja es acanalada, con bordes no espesados y ensanchada por el ápice. El fruto es pequeño, de forma ovalada, con una relación pulpa/hueso baja, un peso medio de 1,9 g y su periodo medio de maduración se encuentra entre la segunda semana de diciembre y la segunda de enero. Normalmente las aceitunas se recolectan antes de su madurez total. Presenta una elevada productividad y un rendimiento de aceite del 20% (ASOLIVA, 2014). Los aceites que se obtienen a partir de esta variedad son aceites frutados, con un olor a manzana fresca acompañado de cierta suavidad y dulzura y un regusto final almendrado verde. Además, son aceites muy frescos y jóvenes que por su composición son algo más delicados que otras variedades frente a la oxidación, por lo que es necesario mantenerlo en la oscuridad y a temperatura baja para garantizar su protección en el tiempo.

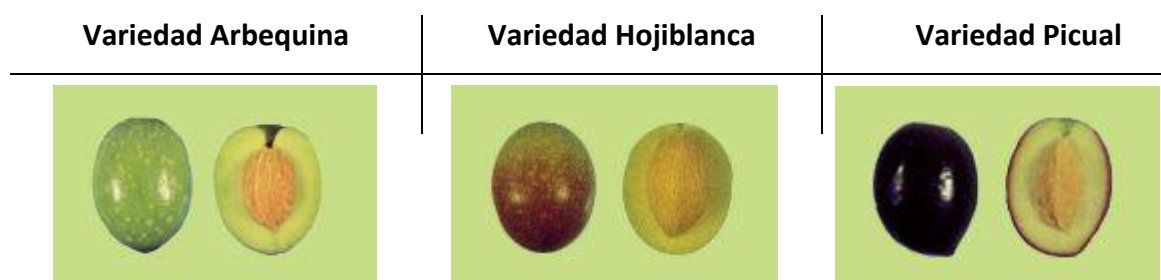
**Hojiblanca:** el nombre de esta variedad se debe al color del envés de la hoja que le confiere claridad al árbol, con un aspecto plateado en la lejanía. Su área de influencia se extiende por el este de la provincia de Sevilla, el sur de Córdoba y todo el norte de la provincia de Málaga. Su uso es tanto para aceituna de mesa como para la producción de aceite. El árbol es de vigor medio a bueno, con ramas largas y fructíferas aunque algo péndulas. La hoja es parcialmente acanalada, alargada y con envés plateado. El fruto suele ser de tamaño grande a grueso, y alcanza una media de 4,3 g de peso. Tiene una



maduración algo tardía, desde finales de noviembre a finales de diciembre. Presenta un bajo rendimiento de aceite (17-19%) (ASOLIVA, 2014). El aceite muestra una inmensa gama de *flavores*, pero se pueden destacar los atributos de dulzura al inicio de la cata, frutado herboso fresco en el aroma, ligero amargor a fruta verde y otras frutas, ligero picante en garganta y regusto final almendrado.

**Picual:** es la variedad más importante del mundo, representa el 50% de las aceitunas y árboles de España y aproximadamente el 20% mundial. Es característica de Andalucía, y su nombre se debe a la forma del fruto como un pezón pronunciado terminado en pico y su tamaño medio es de 3,2 g. Su maduración transcurre en la segunda semana de noviembre hasta la tercera semana de diciembre y su rendimiento puede alcanzar hasta un 27% de aceite (ASOLIVA, 2014). El árbol presenta un gran vigor, de ramas algo cortas, ramificadas con tendencia a producir brotes y chupones. La hoja es algo alargada, y ensanchada en su mitad superior. El fruto es generalmente de tamaño medio a grueso. Desde el punto de vista físico-químico, el aceite resulta excelente por su composición de ácidos grasos y su cantidad de antioxidantes naturales, con alto contenido en ácido oleico, bajo contenido en ácido linoleico y su elevado contenido en polifenoles, con lo que lo convierten en el aceite más estable a la oxidación. En el caso de los aceites de llano son aceites de gran cuerpo, normalmente amargos, con cierto sabor a madera. En la montaña, suelen ser más dulces aunque con un flavor "a fresco" y agradable.

Las imágenes de las variedades de aceituna seleccionadas en este estudio se pueden apreciar en la siguiente figura (figura 4.10).



**Figura 4.10. Imágenes de las variedades de aceitunas estudiadas (Arbequina, Hojiblanca y Picual) (ASOLIVA, 2014).**

Los aceites con denominación de origen analizados en el presente estudio han sido: Les Garrigues (variedad Arbequina), Estepa (variedad Hojiblanca) y Sierra de Segura (variedad Picual). Sus características se describen a continuación:

#### Denominación de Origen Protegida Les Garrigues

La DOP Les Garrigues, fue reconocida en 1975 por el estado Español, y certificada por la Unión Europea como DOP en 1996, por los rigurosos controles de producción y elaboración del Consejo Regulador de Cataluña. La zona de producción del aceite de oliva con denominación de origen Les Garrigues está constituida por los términos municipales situados al sur de la provincia de Lérida, en las comarcas de Les Garrigues, Segrià y Urgell. Se caracteriza por tener un terreno seco con lluvias escasas donde el cultivo más importante es el olivo, y un clima con temperaturas que oscila entre mínimas de  $-2^{\circ}\text{C}$  y máximas de  $24^{\circ}\text{C}$ . El número de árboles por hectárea es de 100 a 120, y se sitúa a una altitud de 368 m sobre el nivel del mar (Consejo Regulador de la Denominación de Origen Les Garrigues, 2014). Las variedades de aceituna admitidas en esta denominación son Arbequina y Verdiell. De estas dos, un 90% como mínimo de las olivas de las que se extrae el aceite tiene que ser de la variedad Arbequina. Esta denominación de origen protege sólo los aceites de oliva virgen de calidad extra que tengan una acidez inferior al 0,5%, un índice de peróxidos máximo de 15 miliequivalentes (meq) de oxígeno activo por kilogramo de aceite y una humedad  $< 0,1\%$ ; y se distinguen dos tipos de aceite: Frutado (de color verdoso y sabor almendrado amargo) y dulce (de color amarillo y sabor dulce) (Reglamento 1902/2004).

### Denominación de Origen Protegida Estepa

El Consejo Regulador de la DOP Estepa se constituyó en 2003 y fue reconocido oficialmente por la Junta de Andalucía en 2004. La zona de producción está constituida por 11 términos municipales de la provincia de Sevilla (Aguadulce, Badolatosa, Casariche, El Rubio, Estepa, Gilena, Herrera, La Roda de Andalucía, Lora de Estepa, Marinaleda y Pedrera) y uno de la provincia de Córdoba (Miragenil, situado en el margen izquierdo de Puente Genil). La comarca de Estepa posee suelos rojos, clima mediterráneo subtropical, con temperaturas medias de 15-18°C y se encuentra a 200-400 m de altitud sobre el nivel del mar llegando a 800 m en alineaciones montañosas de altitud (Consejo Regulador de la Denominación de Origen Estepa, 2014). La DOP Estepa ampara aceites de oliva virgen extra monovarietales elaborados a partir de la variedad Hojiblanca o Arbequina, a partir de una mezcla de las variedades Hojiblanca y Arbequina, o bien a partir de una mezcla de Hojiblanca, Arbequina, Manzanilla, Picual y Lechín de Sevilla. Serán necesariamente aceites de oliva virgen extra con una puntuación organoléptica mayor o igual a 7, una acidez hasta 0,3% de ácido oleico, un índice de peróxidos hasta 15 miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite y un índice de absorción al ultravioleta (K270) como máximo de 0,18. Los aceites de esta denominación de origen son muy equilibrados y afrutados, presentan aromas muy variados, en función del porcentaje de representación de las variedades su frutado de aceituna más verde que madura, aceituna verde algo madura y aceituna verde madura. En boca presentan un ligero amargor, y ligera sensación picante, característica de los aceites obtenidos a comienzo de campaña (Orden APA/3823/2004 y Orden de 4 de abril de 2011).

### Denominación de Origen Protegida Sierra de Segura

La DOP Sierra de Segura surgió a comienzos de 1979 en la provincia de Jaén, zona Sierra de Segura. En 1993 fue reconocida por el Ministerio de Agricultura, y en 1996 la UE le confirió la máxima protección con un distintivo de DOP. La zona de producción de la Denominación de Origen Protegida Sierra de Segura comprende los siguientes términos municipales de la comarca de la Sierra de Segura, Jaén: Beas de Segura, Benatae, Chiclana

de Segura, Génave, Hornos de Segura, Orcera, La Puerta de Segura, Puente de Génave, Segura de la Sierra, Santiago-Pontones, Siles, Torres de Albánchez y Villarrodrigo. La mayor parte de los olivares se encuentran situados en el Parque Natural de Segura, Cazorla y Villas a una altitud media de 899 metros, produciéndose altibajos de temperaturas y la precipitación media anual más alta de la provincia de Jaén, lo que da lugar a un microclima donde se produce mayoritariamente el olivar de la variedad Picual (Consejo Regulador de la Denominación de Origen Sierra de Segura, 2014). La denominación de origen ampara aceites de oliva virgen extra obtenidos a partir de las variedades Picual, Manzanillo de Jaén, Royal y Verdala. Los aceites de oliva virgen extra amparados por esta denominación de origen deberán estar elaborados al menos en un 90% con la variedad Picual. Se trata de aceites ligeramente amargos y picantes, con una gran estabilidad, con aromas frutados que recuerdan a la manzana, tomate y hierba fresca. Y presentan colores entre amarillo y verdoso.

Los aceites de esta denominación presentan una acidez menor de 0,8, un índice de peróxidos menor de 19, una humedad menor del 0,1% y un porcentaje de impurezas menor del 0,1%. Los aceites son de color amarillo-verdoso, frutados, aromáticos, ligeramente amargos y de gran estabilidad (ORDEN de 4 de noviembre de 1993).

En la figura 4.11 se muestran las fotografías de cada uno de los aceites comerciales analizados en este estudio. Se encuentran agrupados en parejas en función del principal tipo de aceituna utilizado en la elaboración del aceite. De cada una de las variedades, el aceite situado a la derecha de la fotografía corresponde al aceite de oliva virgen extra denominación de origen, y a la izquierda, el aceite sin denominación de origen.



**Figura 4.11. Fotografías de los aceites de oliva virgen extra comerciales analizados.**

A continuación (tabla 4.4) se describen las características del envase y del etiquetado de los aceites comerciales analizados procedentes mayoritariamente de las variedades de aceituna Arbequina, Hojiblanca y Picual.

Para evitar los efectos negativos de la radiación solar y las altas temperaturas, todas las muestras se almacenaron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Además, con el fin de evitar la oxidación, y en consecuencia, la alteración del aceite, después de cada toma de muestra para la realización de las distintas determinaciones, se sustituyó el oxígeno del interior de las botellas por nitrógeno.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a excepción del análisis de polifenoles mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) que se realizó por duplicado de cada una de las muestras.

**Tabla 4.4. Datos de fecha de consumo preferente, tipo de envase y condiciones de almacenamiento de las muestras comerciales de AOVE analizadas.**

<b>Código del producto</b>	<b>Código de identificación</b>	<b>Marca del producto</b>	<b>Fecha de consumo preferente</b>	<b>Tipo de envase</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
Arbequina	A	Carbonell 750 ml	Noviembre 2011	Vidrio verde	22 °C Oscuridad
Arbequina DOP	ADOP	Les Garrigues Denominación de Origen. OleAurum verd 750 ml	Septiembre 2012	Vidrio verde	22 °C Oscuridad
Hojiblanca	H	Coosur Nueva Cosecha 1L	Junio 2012	Plástico transparente	22 °C Oscuridad
Hojiblanca DOP	HDOP	Oleoestepa Denominación de Origen Estepa 750 ml	Enero 2012	Vidrio marrón	22 °C Oscuridad
Picual	P	Coosur Nueva Cosecha 1L. Picual intenso Jaencoop.	Mayo 2012	Plástico transparente	22 °C Oscuridad
Picual DOP	PDOP	Señorío de Segura. Denominación de Origen Sierra de Segura 750 ml.	Mayo 2012	Vidrio verde	22 °C Oscuridad



## 4.4. METODOLOGÍA

### 4.4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD COMERCIAL

#### Índice y grado de acidez

El grado de acidez o acidez libre de un aceite es el contenido en ácidos grasos libres, expresados en tanto por ciento en peso de ácido oleico según el Reglamento 2568/91 y sus modificaciones posteriores en el Reglamento 183/93, Reglamento 702/2007, Reglamento 1348/2013. Se basa en la determinación de los ácidos grasos libres, mediante volumetría ácido-base frente a una solución de hidróxido de potasio (Reglamento 2568/91; AOCS, 2009a). La acidez libre se puede expresar como grado de acidez, que indica la acidez de 100 gramos de aceite expresado en porcentaje de ácido oleico, o como índice de acidez, que se define como los miligramos de KOH que neutralizan la acidez libre de 1 gramo de grasa.

Para esta determinación, se pesaron aproximadamente 28 g de cada uno de los seis aceites de oliva virgen extra en un erlenmeyer de 250 ml, se añadieron 50 ml de etanol 100% previamente neutralizado y se valoraron con hidróxido de sodio 0,1 N.

Para calcular el grado e índice de acidez se procedió de la siguiente manera:

*Grado de acidez (g ácido oleico/100 g de aceite):*

$$\text{Grado de acidez (\%)} = (282 \times V \times F \times N) / (10 \times P)$$

*Índice de acidez (mg KOH/g aceite):*

$$\text{Índice de acidez} = (56,1 \times V \times F \times N) / P$$

**V** = volumen de hidróxido de sodio gastado.

**F** = factor del hidróxido de sodio.

**P** = peso de la muestra de AOVE.

**N** = normalidad del hidróxido de sodio.



Peso molecular del ácido oleico= 282 g.

Peso molecular del KOH = 56,1 g.

### **Índice de peróxidos**

Los peróxidos son el producto principal de la oxidación del aceite de oliva. De acuerdo al Reglamento 2568/91 y el AOCS Official Method Cd 8b-90 (AOCS, 2009b), el índice de peróxidos (IP) es la cantidad de peróxidos en la muestra (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) que ocasionan la oxidación del yoduro potásico.

Para realizar esta determinación, se pesaron 5 g de aceite en un erlenmeyer de 250 ml, se añadieron 50 ml de una solución de ácido acético:isooctano (3:2 v/v) y se disolvió. A continuación se incorporaron 0,5 ml de solución saturada de yoduro potásico, se agitó y después se añadió agua destilada para parar la reacción. El yodo liberado se valoró con tiosulfato de sodio 0,02 N.

El índice de peróxidos, expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa o aceite (meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite) se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de peróxidos} = (V \times F \times N \times 1000) / P$$

**V** = ml de solución de tiosulfato sódico empleados en el ensayo, convenientemente corregidos (V – V blanco) para tener en cuenta el ensayo en blanco.

**N** = normalidad de la solución de tiosulfato sódico empleada.

**F** = factor de la solución de tiosulfato de sodio.

**P** = peso en gramos de la muestra problema.

### **Índices K**

Los compuestos resultantes de la oxidación del aceite de oliva, la mayoría de tipo carbonílico, absorben luz en la región ultravioleta del espectro. El estudio de los índices K, determinados mediante espectrofotometría, puede proporcionar información sobre la

calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

La determinación de estos índices K y  $\Delta K$ , también descritos en el Reglamento 2568/91 y en sus modificaciones posteriores, se ha realizado de acuerdo al método AOCS Official Method Ch 5-91 (AOCS, 2009c). Se pesaron 0,25 g de cada una de las muestras en un matraz de 25 ml. Se enrasó con isooctano y se sonicó para homogeneizar. Se determinaron las absorbancias a las siguientes longitudes de onda: 232, 268, 264, 272 en cubetas de 1 cm. El disolvente puro, isooctano, se utilizó como blanco.

El valor de K se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$K = D / (C \times S)$$

D = absorbancia en nm a la longitud de onda medida.

C = concentración de la solución en g/100 ml.

S = grosor de la cubeta en cm.

Utilizando los valores de K obtenidos se calculó  $\Delta K$  de la siguiente manera:

$$\Delta K = K_{268} - ((K_{264} + K_{272}) / 2)$$

Según la AOCS, el máximo de longitud de onda de 268 nm o 270 nm se selecciona dependiendo de si el solvente utilizado es isooctano o ciclohexano respectivamente. En la presente Tesis Doctoral el análisis de estos índices se realizó según el AOCS official method, utilizando isooctano como solvente. En consecuencia, se ha determinado la absorbancia a 268 nm, equivalente a la de 270 nm indicada en el Reglamento 2568/91. Aunque en este Reglamento no se contempla la posibilidad de medir la absorbancia a esta longitud de onda y sólo indica trabajar a 270 nm, en la modificación del año 2013 de dicho Reglamento (Reglamento (CEE) n° 1348/2013), considera por igual el índice K<sub>270</sub> y K<sub>268</sub>. A efectos de esta Tesis se tendrá en cuenta el K<sub>268</sub> de igual manera que el K<sub>270</sub>, ya que en ambos casos los límites establecidos en el AOVE son equivalentes.

#### 4.4.2. OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD: DIACILGLICÉRIDOS Y POLIFENOLES TOTALES

##### **Análisis de diacilglicéridos**

Los diacilglicéridos (DAGs) pueden presentarse en forma de dos isómeros, el 1,2- y el 1,3-diacilglicérido en función de la posición en que se encuentran los dos ácidos grasos unidos al glicerol. Los 1,2-diacilglicéridos son intermediarios naturales que se producen como consecuencia de la síntesis o degradación de los triacilglicéridos (TAGs), mientras que los 1,3- se consideran productos de la isomerización química o enzimática de los 1,2- DAGs. El paso del ácido graso en posición 2 a la posición 3 está afectado por la temperatura, el solvente, el pH y la existencia de enzimas lipasas. Los aceites vegetales que se han obtenido mediante procesos de refinado o que han sido almacenados durante largos periodos de tiempo, muestran un aumento de los 1,3-diacilglicéridos. Además, parece ser que el incremento en la cantidad de los 1,3-, o una mayor proporción con respecto a los 1,2- se correlaciona con una disminución de los atributos sensoriales de los aceites (Zhu *et al.*, 2013).

Los compuestos polares presentes en el aceite, incluyendo los mono y los diacilglicéridos son inicialmente extraídos mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Columna Phenomenex. Strata SI-1 Silica (55  $\mu$ m, 70Å) 100 mg/ 6ml. Part No: 8B-S012-JCL). A continuación se realiza una derivatización para incrementar la volatilidad de estos compuestos y posteriormente se determinan las áreas de los picos correspondientes a los 1,3- y 1,2- isómeros mediante cromatografía de gases (German Society for Fat Science, 2005).

Para la determinación de los diacilglicéridos se pesaron 0,1 g de cada uno de los aceites en tubos eppendorf, se disolvieron en 1 ml de tolueno y la mezcla se transfirió a la columna la cual se activó con 2 ml de tolueno. Se añadieron 7 ml de una mezcla de isooctano/diisopropiléter (85:15) en dos fracciones de 3,5 ml para eluir los compuestos hidrofóbicos incluyendo los triacilglicéridos. A continuación se añadieron 7 ml de dietil

éter para eluir la fracción polar, que incluía los DAGs. Posteriormente se eliminó el solvente mediante evaporación con nitrógeno.

Para preparar los derivados sililados se añadieron a la muestra 200 microlitros de reactivo de sililación (50 microlitros de 1 metil-imidazol en 1 ml de MSHFBA (N-metil-N-(trimetil-silil)-hepta-fluorobutiramida)) y se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de llevar a cabo el proceso de sililación, se añadió 1 ml de acetona y se inyectó 1 µl de la solución obtenida en el cromatógrafo de gases.

Para identificar los 1,2- y 1,3-diacilglicéridos, se determinaron los tiempos de retención de los estándares de referencia y las áreas de los picos de los 1,2- y 1,3-DAGs de las muestras de aceite obtenidos mediante cromatografía de gases. Se calculó el porcentaje que suponían las áreas de los 1,2-DAGs frente al total de los 1,2- y 1,3-DAGs.

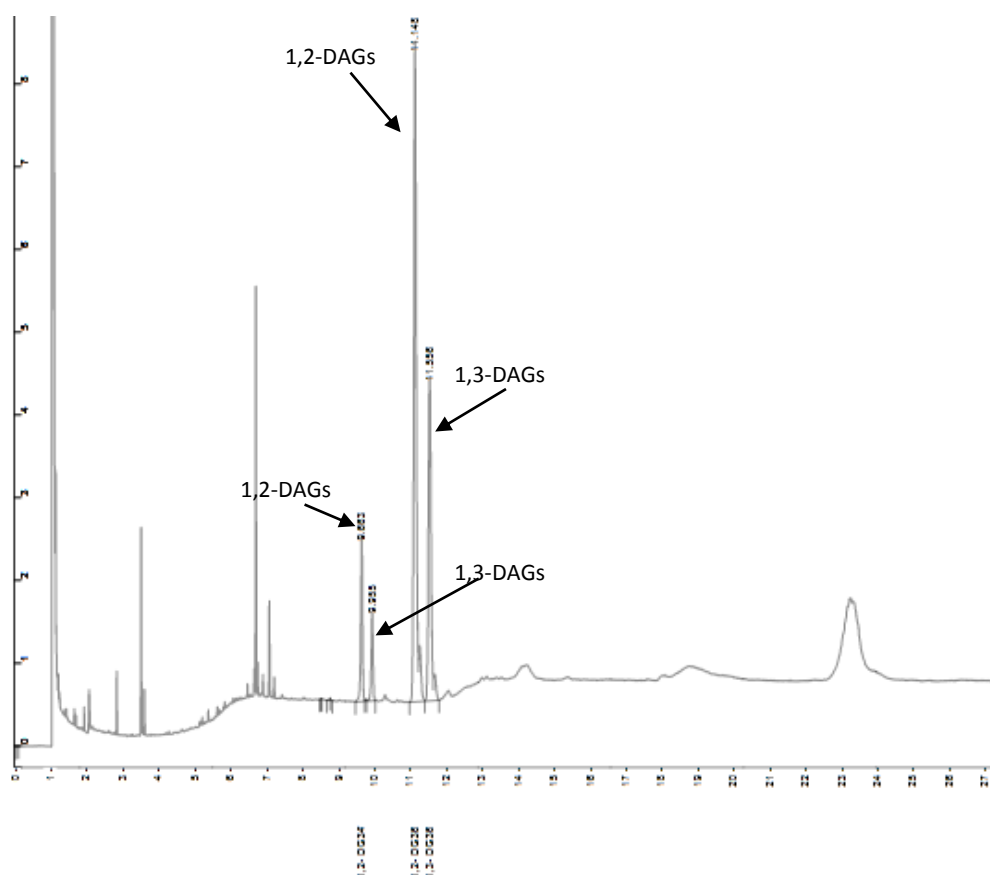
Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Cromatógrafo de gases modelo: Varian 450 GC.
- Sistema de inyección de muestra: CP-8410 con divisor de flujo 1177 split/splitless Siltek.
- Detector: FID (detector de ionización de llama).
- Columna: REX-5. DG-5HT columna capilar (30 cm × 0,25 mm × 0,1 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA).
- Temperatura del inyector: 300° C. Temperatura del detector: 340° C.
- Cantidad de muestra inyectada: 1 µl. Inyección de splits, divisor de flujo 1:50. Caudal: 1 ml/min.
- Gas portador: helio.
- Rampa de temperaturas: inicialmente a 200° C durante 2 minutos. Posteriormente se fue incrementando 20° C/min hasta alcanzar 320° C y se mantuvo durante 6 minutos. Posteriormente se incrementó a 330° C y se mantuvo durante 15 minutos.

Como sustancias de referencia se utilizó una mezcla de isómeros de dipalmitina (dipalmitoilglicerol) y una mezcla de isómeros de distearina (distearoilglicerol).

Este método permite conocer el grado de isomerización de un aceite que se define como la proporción de las áreas de los picos de los 1,2-diacilglicéridos respecto al total de las áreas de los picos de todos los diacilglicéridos (los 1,2- y los 1,3-DAGs).

En la siguiente figura 4.12 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de gases utilizado para determinar las áreas de los picos correspondientes a los 1,2- y 1,3-DAGs y así poder cuantificar el porcentaje que representaban los isómeros 1,2- frente al total.



**Figura 4.12. Perfil cromatográfico de los DAGs obtenido por cromatografía de gases del aceite de oliva virgen extra de la variedad Hojiblanca DOP.**

### **Análisis de polifenoles**

Para determinar el contenido de compuestos fenólicos en el aceite de oliva existen diversos métodos, aunque los más utilizados, y los que se han llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral, son el análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 725 nm, para cuantificar los polifenoles totales, y el análisis cromatográfico mediante HPLC para identificar y cuantificar los distintos compuestos fenólicos.

#### **Análisis de compuestos fenólicos totales por espectrofotometría**

Un método que es ampliamente utilizado para la determinación cuantitativa de los polifenoles totales en el aceite de oliva virgen es el análisis colorimétrico, basado en la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungstato) con los grupos funcionales hidroxilo de los compuestos fenólicos (Gutfinger, 1981; Singleton y Rossi, 1965). El método consiste en extraer los fenoles de la muestra y medir la absorbancia después de producirse la reacción colorimétrica. La popularidad de este método analítico puede atribuirse a su simplicidad y rapidez. La principal desventaja del análisis colorimétrico es su baja especificidad, debido a que la reacción puede ocurrir con cualquier sustancia reductora presente en la muestra (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a). El método tradicional para aislar los compuestos fenólicos del aceite es la extracción líquido-líquido de la solución de aceite con hexano mediante una mezcla de agua-metanol. Los polifenoles son polares, con lo que se localizan en la fracción acuosa.

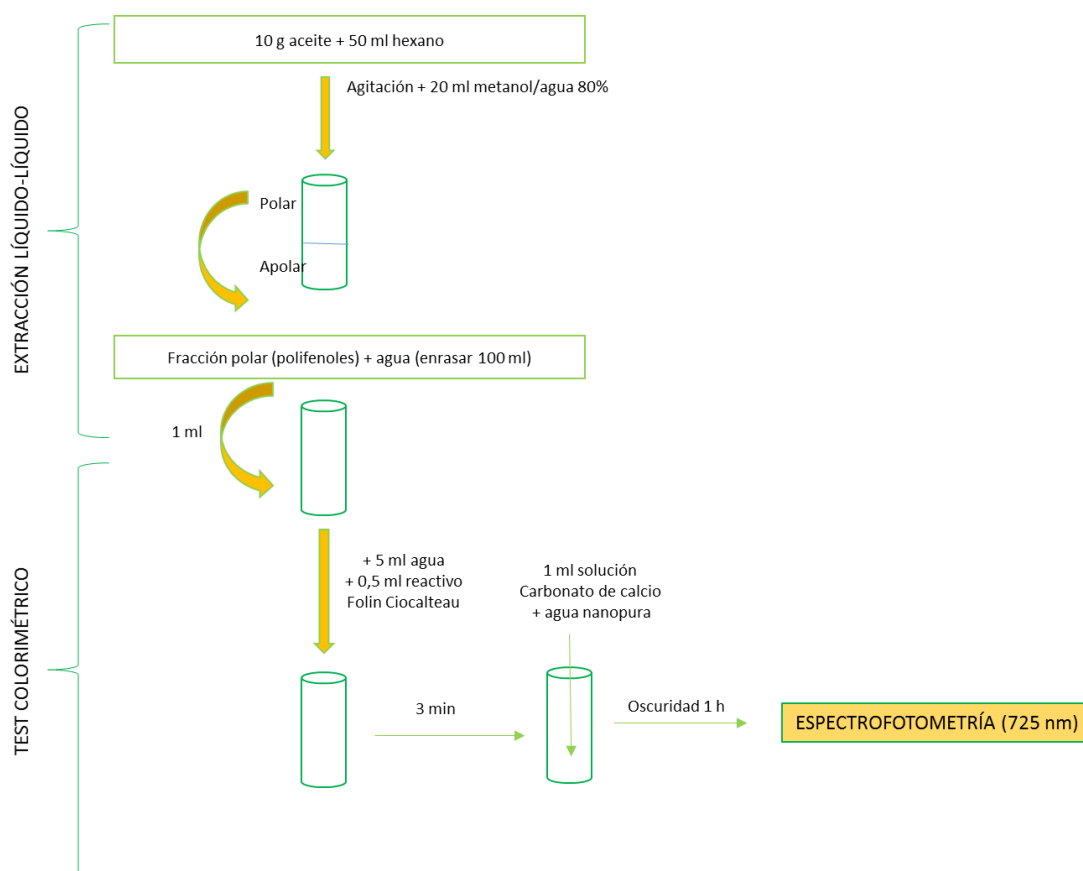
El principio del test colorimétrico Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965) es que los polifenoles, actuando como agentes reductores, reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu bajo condiciones alcalinas produciendo un pigmento coloreado que absorbe a 725 nm. Así, la concentración de los polifenoles totales se ha estimado mediante el reactivo Folin-Ciocalteu a 725 nm y los resultados se han expresado como mg de ácido cafeico por kg de aceite (Morelló *et al.*, 2004).

Para realizar la extracción líquido-líquido de los fenoles totales contenidos en los aceites, se disolvieron 10 gramos de aceite en 50 ml de hexano, se agitó y se extrajo tres veces

con 20 ml de una solución de metanol/agua al 80%. La fracción polar se recolectó en un matraz de 100 ml, se completó con agua y se mantuvo durante toda la noche en oscuridad.

Al día siguiente se transfirieron alícuotas de 1 ml de la muestra a matraces de 10 ml y se adicionaron 5 ml de agua. A continuación se añadieron 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar durante 3 minutos. Se añadió 1 ml de una solución saturada de carbonato de calcio y se agitó. Se enrasó el matraz con agua nanopura y se mantuvo en oscuridad durante una hora. Posteriormente, se midió la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro modelo Shimadzu UV-1700 (Kyoto, Japan) a 725 nm, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm.

En la siguiente figura 4.13 se muestra un esquema del procesamiento de la muestra para su posterior análisis espectrofotométrico.



**Figura 4.13. Esquema del proceso de extracción de polifenoles y del test colorimétrico para la cuantificación de los compuestos fenólicos por espectrofotometría.**

Para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos fenólicos mediante espectrofotometría, se prepararon ocho diluciones patrón de concentraciones conocidas a partir de una disolución de concentración de 100 µg/ml de ácido cafeico en metanol al 80% como se muestra en la siguiente tabla 4.5. El volumen correspondiente de la disolución patrón de ácido cafeico se llevó a un Erlenmeyer de 10 ml y se añadió agua nanopura hasta completar un volumen de 5 ml. A continuación se añadieron 0,5 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y se agitó durante 3 minutos. Después se incorporó 1 ml de una solución de sodio carbonato al 20%. La mezcla resultante se diluyó con agua nanopura hasta un volumen total de 10 ml, consiguiendo la concentración deseada que aparece en la columna de la izquierda de la tabla 4.5. Se dejó una hora y se midió la absorbancia a 725 nm de cada una de las soluciones y se realizó una curva de calibrado.

**Tabla 4.5. Concentraciones de ácido cafeico para la realización de la curva de calibrado.**

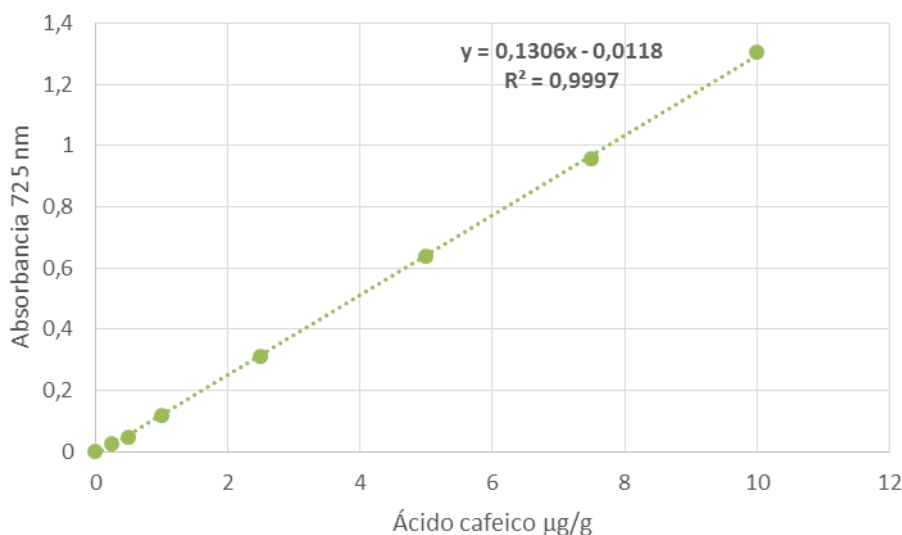
Concentración de ácido cafeico (µg/g)	Volumen de ácido Cafeico 100 µg/mL (mL)	Volumen de agua nanopura (mL)	Volumen total (mL)*
10,00	1,000	0,000	10,00
7,50	0,750	0,250	10,00
5,00	0,500	0,500	10,00
2,50	0,250	0,750	10,00
1,00	0,100	0,900	10,00
0,50	0,050	0,950	10,00
0,25	0,025	0,975	10,00
0,00	0,000	1,000	10,00

\* El volumen total incluye el agua nanopura añadida para enrasar a 5 ml, 0,5 ml del reactivo de Folin Ciocalteu, 1 ml de la solución de sodio carbonato al 20% y el agua nanopura que se utilizó para enrasar finalmente a 10 ml.

En la figura 4.14 se representa la curva de calibrado realizada con las soluciones de concentraciones conocidas de ácido cafeico obtenidas. Esta recta se ha utilizado para



calcular la cantidad total de polifenoles en las seis muestras de aceite de oliva virgen extra a partir de los datos de absorbancia de cada una de ellas.



**Figura 4.14. Curva de calibrado realizada con ácido cafeico**

Los valores de absorbancia obtenidos al analizar las seis muestras de aceite de oliva virgen se interpolaron en la ecuación de la recta de regresión obtenida, calculándose de esta forma la concentración. Los resultados se expresaron como mg de ácido cafeico/kg de aceite.

#### Análisis de compuestos fenólicos por HPLC

El otro método utilizado en la presente Tesis Doctoral para el análisis y cuantificación de polifenoles ha sido la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que se trata de un método más sensible y específico que la espectrofotometría aunque más costoso y menos rápido. Las condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de los compuestos fenólicos en aceites de oliva virgen por técnicas de HPLC difiere de unos autores a otros. En la tabla 4.6 se comparan las condiciones cromatográficas aplicadas por diversos autores.

**Tabla 4.6. Revisión bibliográfica de la metodología de la determinación de compuestos fenólicos totales en aceite de oliva virgen.**

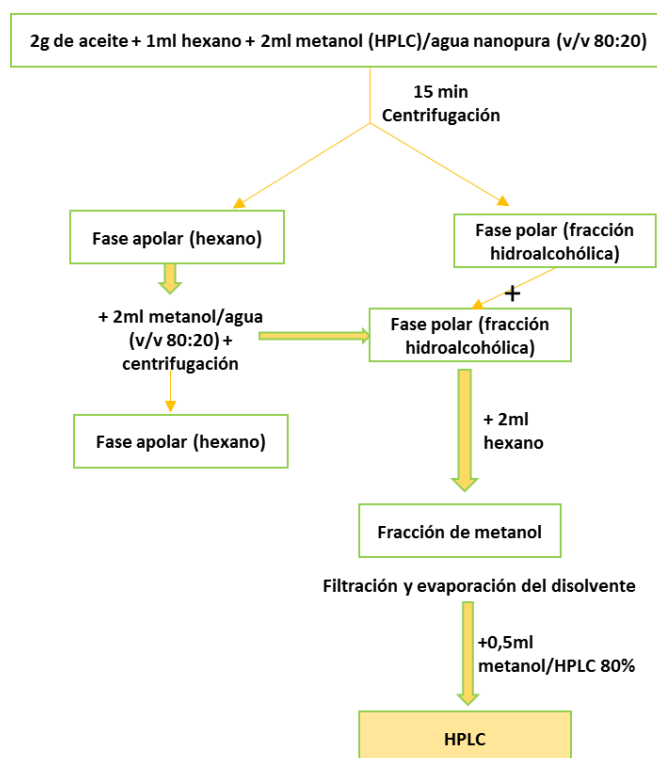
REFERENCIAS	EXTRACCIÓN	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA	SISTEMA DE DETECCIÓN
Brenes <i>et al.</i> , 1999.	Según Montedoro <i>et al.</i> , 1992.	A: Agua 90% y 0,2% ácido acético B: 10% metanol.	Spherisorb ODS-2 (5 $\mu$ m, 25 cm x 4.6 mm I.D.	Fotodiodo array; MS; NMR. $\lambda$ =280 nm.
Bonoli <i>et al.</i> , 2004.	Según Pirisi <i>et al.</i> , 1997 modificado según Rotondi <i>et al.</i> , 2004.	A: Agua/ácido fórmico (99,5:0,5 v/v) B: gradiente acetonitrilo descrito por Rotondi <i>et al.</i> , 2004.	C18 Luna, 5 $\mu$ m, 25 cm x 3 mm I.D. (Phenomenex, Torrance, CA).	Diodo array UV-Vis detector (DAD), y MSD $\lambda$ =280 nm.
Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2005a.	Según Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2004.	A: Agua (99,5%)/ácido acético (0,5%) B: acetonitrilo.	C18 Luna, 5 $\mu$ m I.D., 25 cm x 3.0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), con una precolumna C18 (Phenomenex).	Diodo array UV-vis detector, y un detector de MS. $\lambda$ =240 y 280 nm.
García <i>et al.</i> , 2003.	Extracción líquido-líquido con N, N-dimetil-formamida (DMF).	Según Brenes <i>et al.</i> , 1999.	Spherisorb ODS-2, 5 $\mu$ m, 25 cm x 4.6 mm I.D.	DAD; fluorescencia $\lambda$ = 280 y 340 nm.
Gómez Alonso <i>et al.</i> , 2002.	Según Mateos <i>et al.</i> , 2001.	A: agua + ácido acético 5% B: metanol C: acetonitrilo.	Spherisorb S3 ODS-2, 25 cm x 4,6 mm I.D. 5 $\mu$ m.	DAD (240, 280, 335 nm).
Lesage <i>et al.</i> , 2001.	Se ajustó el pH a 3 con HCl y se extrajo con acetato de etilo (1:1, v/v).	A: 0,01% ácido acético en agua B: acetonitrilo.	Columna C18 de fase reversa Symetry 3,5 mm, 4,6 x 100 mm.	UV/VIS $\lambda$ = 280 nm.
Pirisi <i>et al.</i> , 2000.	<i>n</i> -hexano y CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (v/v, 60/40).	Método 1: método de Pirisi <i>et al.</i> , 1997 Método 2: método HPLC de Montedoro <i>et al.</i> , 1992.	Spherisorb ODS-2, 250 mm x 4.6 mm I.D., 3 $\mu$ m.	UV; DAD $\lambda$ = 225 y 280 nm.

En la presente Tesis Doctoral, el método de extracción que se ha llevado a cabo ha sido el descrito por Pirisi *et al.*, 2000. Se utilizaron dos fases móviles A y B, de la siguiente manera: A: Agua (99,5%)/ácido acético glacial (0,5%) B: Acetonitrilo (90%)/Agua (9,5%)/ácido acético (0,5%). La fase estacionaria estaba compuesta por una columna de fase reversa C18 Inertsil ODS-3, 4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m i.d, y el sistema de detección estaba

compuesto por un detector Agilent Technologies 1200 Series UV-vis detector. Los análisis se llevaron a cabo a una longitud de onda de 240 y 280 nm.

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), de acuerdo al método descrito por Pirisi *et al.* (2000) por su especificidad y sensibilidad y adaptado a las muestras objeto de este estudio. Para ello, se pesaron 2 gramos de aceite y se disolvieron en 1 ml de hexano. Los compuestos fenólicos se extrajeron con 2 ml de metanol (HPLC)/agua nanopura (v/v, 80:20). La mezcla se agitó con el vórtex durante unos 30 segundos y se centrifugó después durante 15 minutos a 3000 rpm. La capa de hexano se retiró y se recuperó la fracción hidroalcohólica. Se realizaron dos extracciones más sobre la fase no acuosa de hexano utilizando 2 ml de una mezcla de metanol/agua (v/v, 80:20) y se centrifugó para separar las dos fases. Finalmente, se combinaron las fracciones hidroalcohólicas y se lavaron con 2 ml de hexano para eliminar el aceite residual. Se desechó la fase de hexano, la solución de metanol se filtró con un filtro de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  en un matraz de fondo redondo y se evaporó completamente el disolvente utilizando un rotavapor (en vacío) y a baja temperatura ( $< 40^{\circ}\text{C}$ ). La mezcla se disolvió posteriormente en 0,5 ml de metanol/HPLC (80%), y se filtró con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se inyectó en el cromatógrafo HPLC.

En la siguiente figura 4.15 se muestra un esquema del procesamiento de la muestra para su posterior inyección en el aparato de HPLC.



**Figura 4.15. Esquema de la determinación del contenido de polifenoles mediante HPLC.**

El equipo instrumental empleado consistió en un equipo de cromatografía HPLC *Agilent Technologies 1200 Series*, formado por los siguientes elementos:

- Inyector: válvula de inyección con bucle de volumen 20  $\mu$ L.
- Columna: Inertsil ODS-3, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m i.d., (GL Science Inc, Japan) y una precolumna C 18.
- Detector: UV-vis fijado a una longitud de onda fija.

Se aplicaron las siguientes condiciones cromatográficas:

- Fase móvil: mezcla de dos disolventes. A: agua:ácido acético (99,5:0,5) y B acetonitrilo: agua: ácido acético (90:9,5:0,5).
- Flujo: 1 ml/min.
- Temperatura ambiente.

El volumen de inyección fue de 10 µl y el detector UV se ajustó a una longitud de onda de 240 y 280 nm. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado. El gradiente de concentración de A y B se estableció tal y como aparece en la tabla 4.7:

**Tabla 4.7. Gradiente de A y B a lo largo del tiempo de elución.**

Tiempo (min)	0	2	15	20	25	30	60
A%	89	89	70	65	60	55	0
B%	11	11	30	35	40	45	100

Para la identificación y cuantificación de los polifenoles se utilizaron los patrones comerciales que se describen a continuación:

- **DOPAC** (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) ARCOS Organic, New Jersey, USA.
- **Oleuropeína** (glucósido de oleuropeína) Indofine Chemical Company, Inc., Hillsborough, NJ, USA.
- **Tirosol** Indofine Chemical Company, Inc., Hillsborough, NJ, USA.
- **Hidroxitirosol** Indofine Chemical Company, Inc., Hillsborough, NJ, USA.

La identificación y cuantificación del tirosol y el hidroxitirosol se realizó con los correspondientes compuestos comerciales medidos a una longitud de onda de 280 nm, y la oleuropeína con la oleuropeína comercial a 240 nm. El ácido elenólico se cuantificó con la curva de calibrado de la oleuropeína a 240 nm (**Carrasco-Pancorbo et al., 2007**). El DOPAC analizado en los patrones se utilizó como patrón interno.

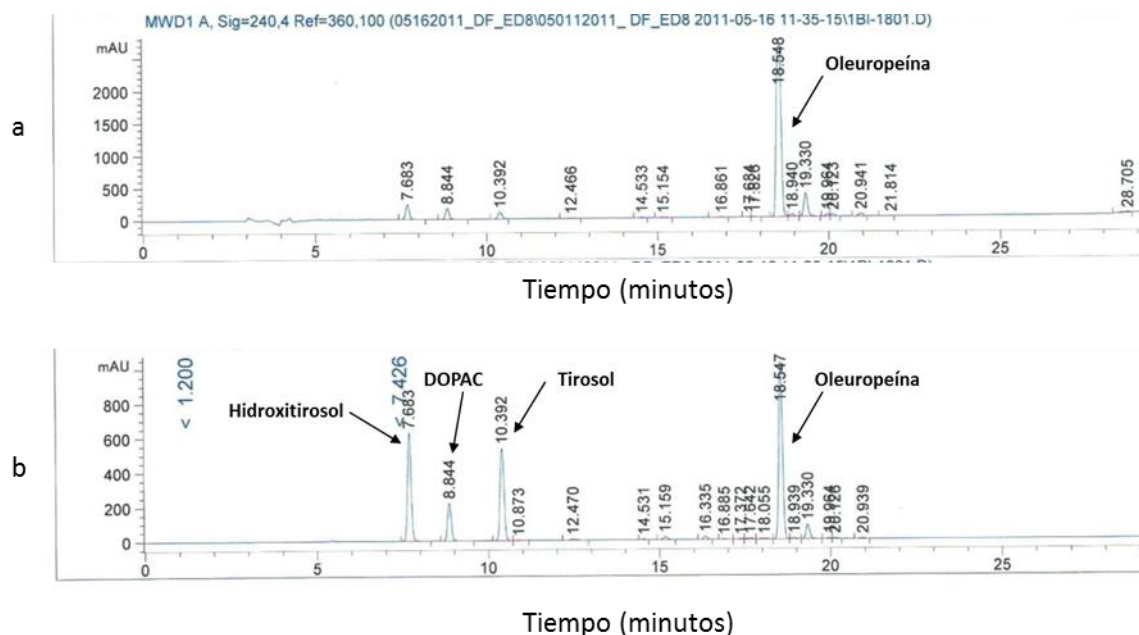
Se prepararon 4 disoluciones a partir de los 4 compuestos fenólicos comerciales con metanol/agua (50/50) a las concentraciones de 2 mg/ml para tirosol, 0,5 mg/ml para DOPAC, 10 mg/ml para oleuropeína, y 1,5 mg/ml para hidroxitirosol (Carrasco-Pancorbo et al., 2007). A partir de estas concentraciones iniciales se realizaron seis diluciones decrecientes de 0,25 ml de cada uno de los cuatro compuestos que a continuación se combinaron para obtener 6 mezclas de soluciones patrón con un volumen total de 1 ml cada una (0,25 ml x 4) como se observa en la tabla 4.8.

**Tabla 4.8. Soluciones patrón preparadas a partir de concentraciones determinadas de cada uno de los patrones.**

	Tirosol (mg/ml) (0,25 ml)	Oleuropeína (mg/ml) (0,25 ml)	DOPAC (mg/ml) (0,25 ml)	Hidroxitirosol (mg/ml) (0,25 ml)
<b>Mezcla 1 (1 ml)</b>	0,2	0,5	0,1	0,1
<b>Mezcla 2 (1 ml)</b>	0,5	1	0,15	0,25
<b>Mezcla 3 (1 ml)</b>	0,75	2,5	0,2	0,5
<b>Mezcla 4 (1 ml)</b>	1	5	0,3	0,75
<b>Mezcla 5 (1 ml)</b>	1,5	7,5	0,4	1
<b>Mezcla 6 (1 ml)</b>	2	10	0,5	1,5

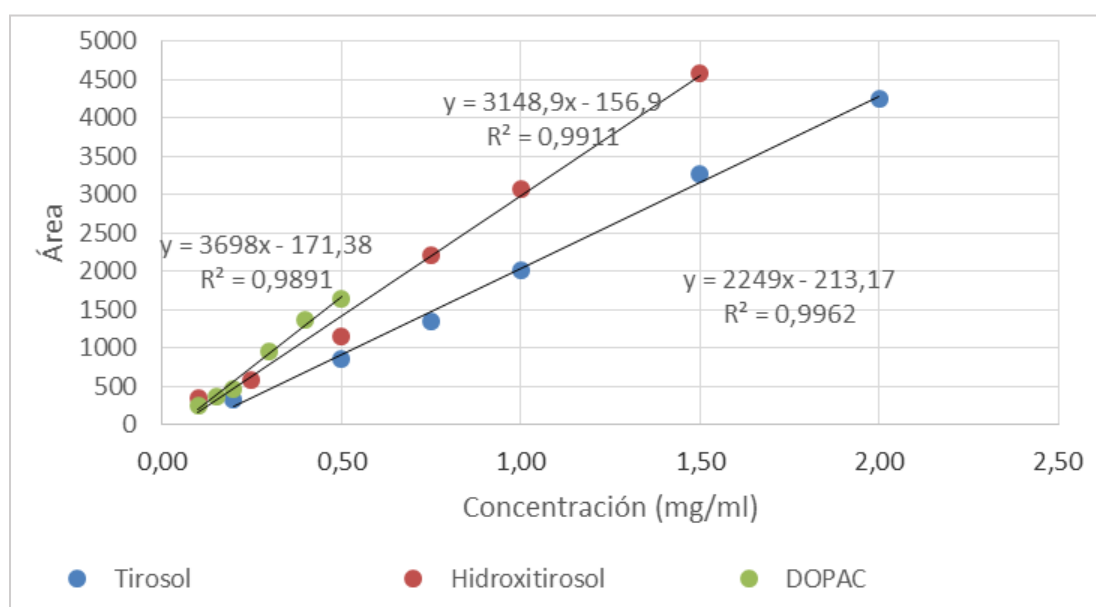
Tras medir la absorbancia mediante HPLC de cada una de estas 6 disoluciones (cada una de ellas conteniendo los 5 compuestos fenólicos a una concentración diferente) se obtuvieron 6 cromatogramas. Teniendo en cuenta el área y la concentración se realizaron las curvas de calibrado correspondientes.

En la parte superior de la figura 4.16 se muestra el perfil cromatográfico de las mezclas de patrones descritos anteriormente. La oleuropeína medida a una longitud de onda de 240 nm aparece a un tiempo de retención de 18,6 minutos y se puede observar en la parte superior de la figura; en la parte inferior aparecen el hidroxitirosol, el tirosol, la oleuropeína y el DOPAC a un tiempo de retención de 7,7; 10,4; 18,6 y 8,9 minutos respectivamente detectados a una longitud de onda de 280 nm.

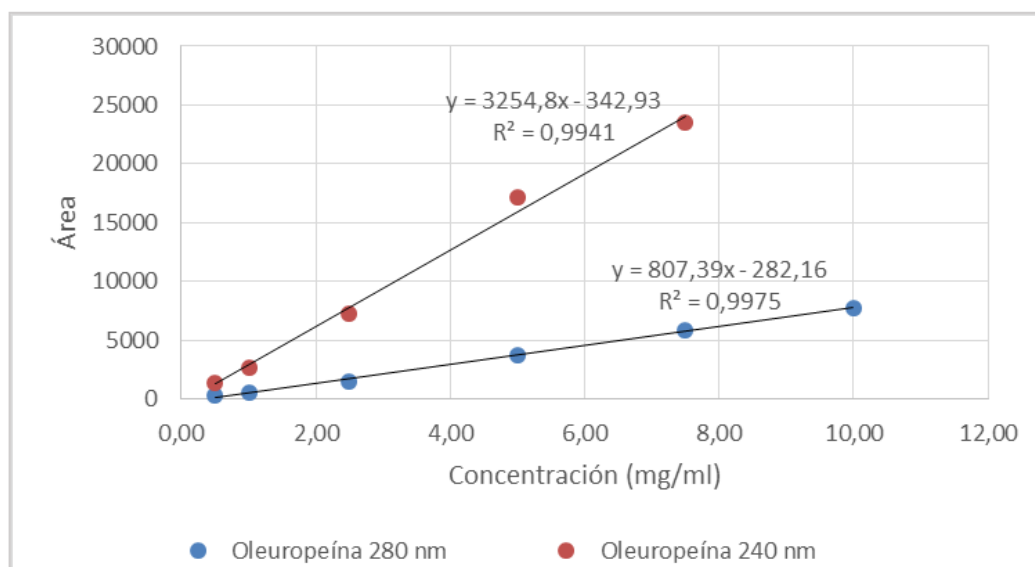


**Figura 4.16. Perfil cromatográfico de los patrones: a) oleuropeína (240 nm), b) hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína (280 nm).**

En las siguientes figuras 4.17 y 4.18 se representan las curvas de calibrado elaboradas con los distintos patrones a las longitudes de onda que se indican.



**Figura 4.17. Curva de calibrado de hidroxitirosol, tirosol y DOPAC medidos a una longitud de onda de 280 nm.**



**Figura 4.18. Curvas de calibrado de la oleuropeína medidas a 280 y 240 nm.**

#### 4.4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Statgraphics plus 4.1 para Windows. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas, empleando un intervalo de confianza del 95% (se considera que existen diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ ). Se utilizó también el test de Tukey para distinguir los grupos homogéneos.

Para completar la comparación entre las muestras de AOVE, se ha llevado a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA). Este análisis estudia la correlación entre todos los resultados obtenidos referentes a la composición química de las muestras analizadas, considerando como variables a los distintos parámetros evaluados y como componentes a unas nuevas variables independientes entre sí, de manera que unas pocas variables (componentes principales) permitirán caracterizar las muestras objeto de este estudio, ya que cada componente está formado por una combinación de variables correlacionadas entre sí. El análisis de componentes principales establece combinaciones lineales



(componentes principales) de los distintos parámetros, lo que permite explicar un determinado porcentaje de la varianza, de forma, que cuantos menos componentes se necesiten para explicar la varianza mejores resultados obtendremos de este análisis.

## 4.5. RESULTADOS

Este segundo estudio de la presente Tesis Doctoral se ha realizado con la finalidad de determinar la calidad comercial y diferenciada de las seis muestras de aceite de oliva virgen extra, tal y como queda establecido en el Reglamento 2568/91 y en sus modificaciones posteriores, atendiendo a los parámetros del grados de acidez, el índice de peróxidos y la absorción de la luz en el ultravioleta mediante los índices K. Para ello, se han comparado los resultados obtenidos en el estudio con los límites que establece este Reglamento para que un aceite se pueda considerar virgen extra. En el caso de los aceites con denominación de origen protegida los parámetros de calidad que deben cumplir son más estrictos y están además regulados por el Consejo Regulador de cada DOP.

Asimismo, se ha valorado el contenido de diacilglicéridos y polifenoles, que como se ha visto, aunque no se tienen en cuenta para valorar la calidad del aceite de oliva virgen extra mediante la legislación europea ni la americana, sí están contemplados como parámetros de calidad exigibles por las sociedades alemana y australiana.

#### 4.5.1. PARÁMETROS QUÍMICOS DE CALIDAD COMERCIAL Y CALIDAD DIFERENCIADA

Los parámetros químicos que se utilizan para detectar la alteración del aceite por causas naturales y no debidas a la adulteración del mismo, son el grado de acidez, el índice de peróxidos y la absorción de luz en la región ultravioleta del espectro (Mendoza *et al.*, 1997). Estos parámetros, que han sido determinados en la presente Tesis Doctoral y que se encuentran descritos a continuación, proporcionan información del grado de degradación del aceite, que junto a las características organolépticas, dan una idea de su calidad global y permite su clasificación comercial.

##### **Índice y grado de acidez**

Los ácidos grasos se pueden liberar de los triacilglicéridos presentes en la aceituna cuando el fruto es defectuoso, debido por ejemplo a una recolección inadecuada o a enfermedad del fruto. Si se libera sólo uno de los tres ácidos grasos del TAG se forma un DAG, y si son dos o tres los ácidos grasos liberados se forma un monoacilglicérido o un glicérido respectivamente. Por tanto, una acidez elevada indica que el aceite es de baja calidad. Generalmente, el aceite de oliva virgen extra procedente de frutos sanos tiene bajos valores de ácidos grasos libres. Los aceites refinados tienen incluso valores más bajos, dado que durante el procesado estos ácidos grasos son neutralizados. Otro factor que contribuye a la acidez del aceite de oliva es la acción de las bacterias que liberan lipasas en el fruto de la oliva produciendo la hidrólisis de los TAGs y la consiguiente liberación de ácidos grasos. Las levaduras y los mohos tienen también elevada actividad lipolítica (Kiritsakis, 1998). El agua favorece el crecimiento de microorganismos lo que conduce a la reacción de hidrólisis. La lipasa es soluble en agua, pero no se disuelve bien en aceite, por lo que una vez el agua y los sólidos son eliminados del aceite, los ácidos grasos libres en el extracto de aceite se mantienen constantes. Un almacenamiento inapropiado durante largos periodos de tiempo es otra de las situaciones en las que se favorece el crecimiento de microorganismos con la consiguiente hidrólisis de los TAGs y liberación de los ácidos grasos (Kiritsakis, 1998; Frankel *et al.*, 2010).

En la tabla 4.9 que se muestra a continuación se presentan los valores obtenidos del grado e índice de acidez determinados en el presente estudio mediante valoración ácido-base de las seis muestras de AOVE (tres aceites de calidad comercial y tres de calidad diferenciada).

**Tabla 4.9. Índice y grado de acidez de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

<b>Código del producto</b> (envase)	<b>GRADO DE ACIDEZ</b> (% ácido oleico) Media $\pm$ SD	<b>ÍNDICE DE ACIDEZ</b> (mg KOH/aceite) Media $\pm$ SD
<b>Arbequina</b> (Vidrio verde)	0,312 <sup>a</sup> $\pm$ 0,005	0,620 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01
<b>Arbequina DOP</b> (Vidrio verde)	0,126 <sup>b</sup> $\pm$ 0,005	0,250 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01
<b>Hojiblanca</b> (Plástico transparente)	0,221 <sup>c</sup> $\pm$ 0,043	0,490 <sup>c</sup> $\pm$ 0,106
<b>Hojiblanca DOP</b> (Vidrio marrón)	0,154 <sup>b</sup> $\pm$ 0,012	0,307 <sup>b</sup> $\pm$ 0,023
<b>Picual</b> (Plástico transparente)	0,237 <sup>c</sup> $\pm$ 0,009	0,472 <sup>c</sup> $\pm$ 0,018
<b>Picual DOP</b> (Vidrio verde)	0,114 <sup>b</sup> $\pm$ 0,003	0,227 <sup>b</sup> $\pm$ 0,006

Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD) (n=3), las diferentes letras representadas como superíndice indican variaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En la tabla 4.10 se recogen los parámetros de calidad comercial y calidad diferenciada que deben cumplir los diferentes tipos de AOVE objeto de estudio. Como se puede observar, todos los AOVE analizados en este trabajo cumplen con los requerimientos de calidad comercial y calidad diferenciada en lo que respecta a su índice y grado de acidez.

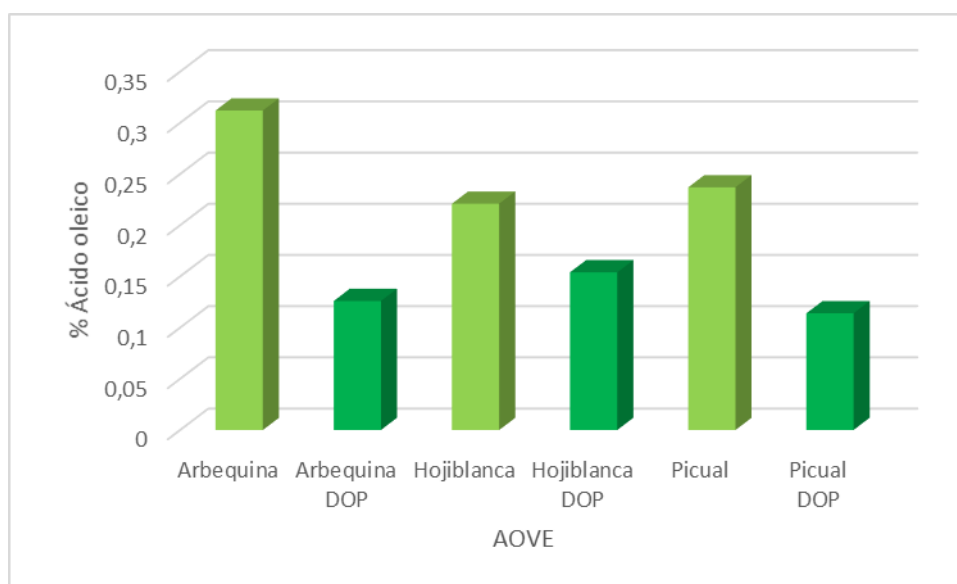
**Tabla 4.10. Grado de acidez e índice de peróxido en los aceites de oliva virgen extra según el R. 2568/91 y la regulación correspondiente a cada DOP.**

Parámetro	Reglamento 2568/91	DOP Les Garrigues (R. 1902/2004)	DOP Estepa (Orden APA/3823/2004)	DOP Sierra de Segura (Orden de 4 de noviembre de 1993)
<b>Grado de acidez</b> (% ácido oleico)	$\leq 0,8$	$< 0,5$	$\leq 0,3$	$\leq 0,8$
<b>Índice de peróxidos</b> (meq O <sub>2</sub> /kg)	$\leq 20$	$\leq 15$	$\leq 15-18^*$	$< 19$

\* Valor máximo al que puede llegar en el caso de aceites de la campaña certificados que permanezcan en bodega hasta el momento del envasado.

La muestra analizada que ha presentado menor grado de acidez ha sido el AOVE con DOP de la variedad Picual, con un valor de 0,114%, seguido muy de cerca por el AOVE Arbequina DOP con un grado de acidez de 0,126%. El mayor valor de este parámetro lo ha presentado el aceite sin denominación de origen de la variedad Arbequina, con un resultado de 0,312%, lo que indica mayor grado de hidrólisis.

En la siguiente figura 4.19 se muestra una gráfica con los resultados del análisis del grado de acidez.



**Figura 4.19. Grado de acidez en las seis muestras de AOVE analizadas.**

Como era de esperar, todos los aceites DOP presentaron menor acidez que los aceites sin DOP para todas las variedades. Además, los valores se encuentran por debajo de los límites establecidos por la legislación vigente, así como por los Consejos Reguladores correspondientes a cada DOP.

Con respecto a los datos obtenidos por otros autores, los valores del grado de acidez indicados en este trabajo han sido más bajos que en el trabajo realizado por Aparicio *et al.* (1999) quienes analizaron este parámetro en los aceites de oliva virgen de las variedades Hojiblanca y Picual de acuerdo al Reglamento 2568/91 obteniendo un grado de acidez de 0,44% en el AOVE de la variedad Hojiblanca y 0,42% en el AOVE de la variedad Picual.

En el presente estudio se ha obtenido un menor grado de acidez en el aceite DOP de la variedad Picual, mientras que el aceite de la variedad Arbequina sin DOP ha presentado el valor más elevado. Estos resultados coinciden con el estudio de Gutiérrez *et al.* (2002) donde se obtuvieron los valores más bajos en el aceite de la variedad Picual y los más elevados en la variedad Arbequina (0,15 y 0,25% respectivamente).

Se ha visto que el grado de acidez puede variar de una cosecha a otra, en función del método de extracción y del nivel de irrigación. Dabbou *et al.* (2010) estudiaron el grado de acidez en un aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina (sin DOP) en aceites donde las aceitunas de las que se extrajeron habían sido irrigadas de manera diferente. El grado de acidez en el aceite que procedía de las aceitunas más irrigadas fue similar al obtenido en el presente trabajo en el aceite de la misma variedad (0,28% el menos irrigado, 0,5% el de irrigación media y 0,28% el más irrigado). Sin embargo, Gimeno *et al.* (2002), analizaron aceites de oliva virgen de la variedad Arbequina de las denominaciones de origen Les Garrigues y Siurana, procedentes de dos cosechas diferentes y con diferentes métodos de extracción. En este caso, el grado de acidez no mostró diferencias en función de los métodos de extracción llevados a cabo ni entre los dos tipos de aceites. Por otra parte, en este estudio de Gimeno *et al.* (2002) el grado de acidez analizado fue parecido al obtenido en la muestra Arbequina DOP Les Garrigues de esta Tesis, mostrando valores de 0,14%.

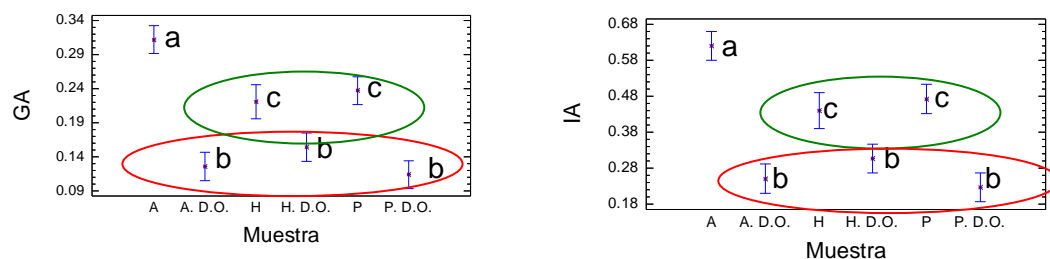
El envase en el que se encuentran contenidos los aceites determina en gran medida el grado de acidez cuando el aceite va a ser almacenado durante periodos prolongados. El aceite de oliva virgen extra se envasa normalmente en recipientes de vidrio, hojalata o plástico. El vidrio y el plástico favorecen los procesos de foto-oxidación debido a la acción de la luz, y el plástico permite además la entrada de gases como el oxígeno (Méndez y Falqué, 2007). Los aceites del presente trabajo (tabla 4.9), como ya se ha comentado, estaban envasados en distintos recipientes, lo que puede favorecer, dependiendo del envase, los procesos de oxidación del aceite. También se ha mencionado que después de cada análisis se sustituía el oxígeno que había en las botellas después de cada toma de muestra por nitrógeno para intentar reducir al máximo la oxidación.

En el presente estudio, dentro del grupo de AOVE sin DOP no se observó correlación entre los valores de acidez obtenidos y el tipo de envase del aceite (plástico/vidrio, transparente/coloreado) ya que los aceites de oliva virgen extra sin DOP Picual y Hojiblanca, envasados en botella de plástico transparente presentaron un grado de acidez inferior al del aceite de oliva de la variedad Arbequina, del que se podría esperar una menor alteración pues se encontraba envasado en botella de vidrio verde. Sin embargo, los AOVE con DOP envasados en vidrio han presentado menor grado de acidez que los aceites sin DOP envasados en plástico.

Los resultados obtenidos indican que la acidez de los aceites podría estar más influenciada por la variedad de la aceituna, siendo más baja la acidez en Picual y más elevada en Arbequina.

En cuanto al análisis estadístico, al estudiar el índice y el grado de acidez entre los aceites comerciales incluidos en el estudio, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). En las figuras mostradas a continuación, se han representado las medias de los distintos análisis realizados, el análisis de la varianza para determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas, y el test de Tukey para distinguir los grupos homogéneos. Como se observa en la figura 4.20, existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de aceites analizados ( $p < 0,05$ ). Al aplicar el test de Tukey se puede apreciar que existen tres grupos: uno que incluye al

aceite de la variedad Arbequina, con un grado de acidez superior a los demás, otro distinto con los aceites de las variedades Hojiblanca y Picual, y un tercer grupo que engloba a los tres aceites de oliva virgen extra denominación de origen, que presentan un grado e índice de acidez inferior al resto.



**Figura 4.20. Gráficas de medias del grado e índice de acidez.** Test de ANOVA univariante y test de Tukey. (Letras diferentes significan variaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ). (A: Arbequina, A.D.O: Arbequina DOP, H: Hojiblanca, H.D.O: Hojiblanca DOP, P: Picual, P.D.O: Picual DOP).

De esta forma, la variabilidad que existe entre los distintos aceites analizados es estadísticamente significativa, observándose dos grupos homogéneos bien diferenciados: los aceites DOP y los aceites sin DOP.

### Índice de peróxidos

Los peróxidos son el producto principal de la oxidación del aceite de oliva. Este proceso es natural e irreversible, de forma que no se puede evitar aunque sí se puede retrasar su aparición. El oxígeno causante de este proceso puede existir en el ambiente o presentarse disuelto en el aceite. La oxidación de los ácidos grasos insaturados por el oxígeno del aire es un proceso complejo que implica la aparición de radicales libres y sus reacciones, dando multitud de compuestos de reacción, muchos de ellos responsables del conocido olor a rancio. Los primeros productos que se forman son hidroperóxidos o peróxidos, también denominados compuestos de oxidación primaria. Desde el punto de vista químico son oxidantes, característica que se aprovecha para determinar su concentración en el aceite mediante la oxidación del yoduro a yodo y su posterior valoración con



tiosulfato sódico. A la concentración de peróxidos u oxígeno activo en el aceite, expresado en miliequivalentes (meq) de oxígeno activo por kilogramo de aceite, es lo que se conoce como índice de peróxidos. Desde el punto de vista sensorial, los peróxidos son inodoros e insípidos, de forma que no pueden ser percibidos por un panel de catadores. Posteriormente, los hidroperóxidos, sufren una reacción favorecida por la temperatura y se descomponen dando moléculas más pequeñas de diferentes especies químicas como hidrocarburos, ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, etc. y son estos compuestos los que le confieren el sabor a rancio a los aceites (Mendoza *et al.*, 1997).

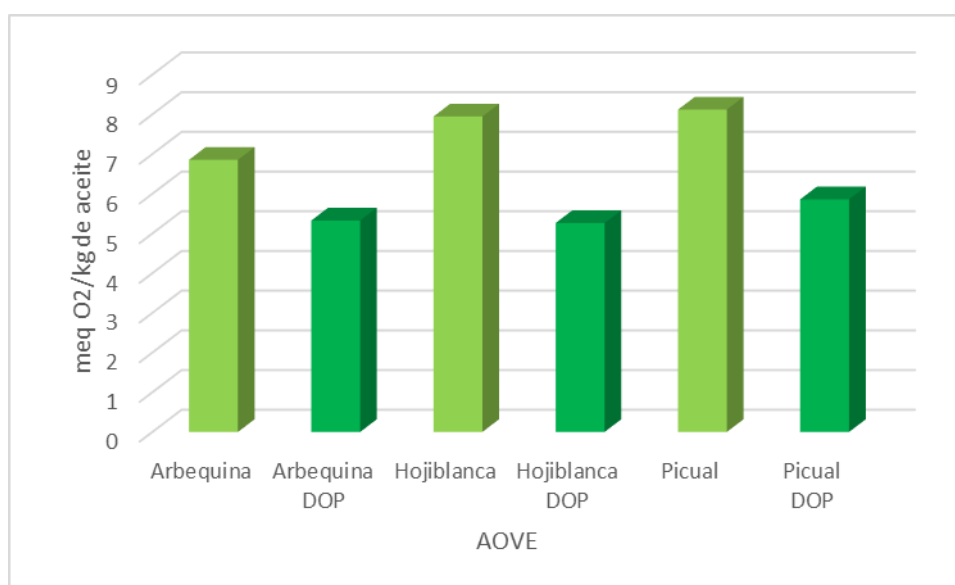
El índice de peróxidos en todos los aceites analizados se ha situado considerablemente por debajo del límite establecido de 20, 19 ó 15 miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa (tabla 4.10) (dependiendo de si es denominación de origen o no y el tipo de DOP), presentando unos valores de entre 5,265 y 8,120 miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa (tabla 4.11 y figura 4.21).

**Tabla 4.11. Índice de peróxidos de los aceites de oliva virgen analizados.**

<b>Código del producto</b> (Envase)	<b>ÍNDICE DE PERÓXIDOS</b> meq de O <sub>2</sub> /kg de aceite
<b>Arbequina</b> (Vidrio verde)	6,856 <sup>a</sup> ± 0,21
<b>Arbequina DOP</b> (Vidrio verde)	5,327 <sup>b</sup> ± 0,41
<b>Hojiblanca</b> (Plástico transparente)	7,946 <sup>a</sup> ± 0,265
<b>Hojiblanca DOP</b> (Vidrio marrón)	5,265 <sup>b</sup> ± 0,445
<b>Picual</b> (Plástico transparente)	8,120 <sup>a</sup> ± 0,363
<b>Picual DOP</b> Vidrio verde	5,860 <sup>b</sup> ± 0,229

Datos expresados como media ± desviación estándar (SD) (n=3), las diferentes letras representadas como superíndice indican significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Los aceites con denominación de origen protegida han sido los que han mostrado menor índice de peróxidos, siendo el de valor más bajo el del aceite de oliva virgen extra variedad Hojiblanca DOP, seguido de Arbequina DOP y Picual DOP. El aceite con mayor índice de peróxidos lo ha presentado la variedad Picual sin DOP, con un valor medio de 8,12 miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa.



**Figura 4.21. Índice de peróxidos de las seis muestras de AOVE analizadas.**

Al igual que en el caso del grado de acidez, el tipo de envase en el que se almacena el aceite determina en gran parte la cantidad de peróxidos presentes en éste, al permitir o impedir el paso de la luz y el oxígeno, influyendo así en el grado de alteración del aceite. Como ya se ha mencionado, el vidrio y el plástico favorecen los procesos de foto-oxidación debido a la acción de la luz, y el plástico permite además la entrada de gases como el oxígeno (Méndez y Falqué, 2007). El AOVE de la variedad Picual sin DOP estaba contenido en un envase de plástico a diferencia del aceite con DOP de la misma variedad, el cual estaba contenido en envase de vidrio verde lo que implica en este último caso una menor exposición lumínica. El envase del AOVE de la variedad Hojiblanca DOP era de

vidrio marrón y el de la variedad Hojiblanca sin DOP de plástico, lo que explicaría en parte el mayor índice de peróxidos analizado en este aceite sin DOP. Así, los aceites con valores más elevados de índice de peróxidos han correspondido a los que estaban contenidos en envase de plástico transparente (Hojiblanca y Picual). El menor índice de peróxidos en los aceites de oliva virgen extra envasados en botellas de cristal puede ser también atribuido a que se trataban de aceites con denominación de origen protegida, los cuales presentan normalmente unos valores más bajos que los que no son DOP debido a que se les exige unos parámetros de calidad más estrictos.

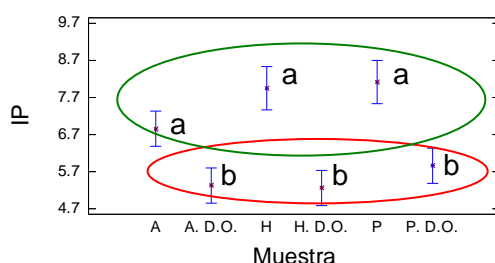
Dentro del grupo de los tres aceites sin DOP, el aceite de variedad Arbequina, que estaba envasado en vidrio verde, ha presentado un índice de peróxidos menor que los aceites de las variedades Hojiblanca y Picual sin DOP, ambos contenidos en envases de plástico transparente.

Autores como Aparicio *et al.* (1999) estudiaron el índice de peróxidos en muestras de AOVE mostrando unos valores de 7,24 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite en el aceite de la variedad Hojiblanca y de 8,65 en el AOVE de la variedad Picual, siendo semejantes a los obtenidos en el presente estudio (7,946 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite en la variedad Hojiblanca y 8,120 en el aceite de la variedad Picual).

Otros autores (Gutiérrez *et al.*, 2002), por el contrario, indican en su estudio un valor más elevado en el AOVE de la variedad Arbequina (7,50 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite) que en el AOVE de la variedad Picual que presentó un índice de peróxidos intermedio (6,60 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite, mientras que en la presente Tesis este aceite mostró el valor más elevado (8,120 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite). El aceite de la variedad Hojiblanca, sin embargo, presentó el valor más bajo de este índice (4,30 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite) al igual que en este trabajo, en el que el aceite de la misma variedad Hojiblanca DOP mostró un valor de 5,265 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite). Otros estudios (Gimeno *et al.*, 2002) indican valores más elevados en el aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina de la DOP Les Garrigues (10,10 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite). Sin embargo, el índice de peróxidos que obtuvieron Dabbou *et al.* (2010), en un aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina (en este caso

sin DOP) fue inferior al que se determinó en este trabajo con valores que variaban entre 3,22 y 5,23 en función del grado de irrigación del cultivo.

En cuanto al análisis estadístico, al aplicar el test ANOVA a los datos obtenidos del índice de peróxidos se observan diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$  entre las muestras, y al realizar el test de Tukey se aprecian dos grupos diferentes entre las medias de los aceites DOP y sin DOP como se puede observar en la figura 4.22, presentando los aceites DOP un índice de peróxidos notablemente inferior a los aceites sin denominación de origen.



**Figura 4.22. Gráficas de medias del índice de peróxidos.** Test de ANOVA univariante y test de Tukey. (Letras diferentes significan variaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ). (A: Arbequina, A.D.O: Arbequina DOP, H: Hojiblanca, H.D.O: Hojiblanca DOP, P: Picual, P.D.O: Picual DOP).

## Índices K

Los cromóforos o asociaciones moleculares de tipo peroxídico procedentes de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico, absorben en la región de los 230-235 nm. Cuando se cuantifica la luz que absorben estos compuestos, a 232 nm se obtiene el denominado K232, que, junto con el índice de peróxidos, se toma como medida de la oxidación inicial o primaria del aceite. Los dienos y trienos conjugados, aldehídos y alfa-dicetonas y las cetonas alfa-insaturadas absorben en la región de los 270 nm, lo que representa un estado de oxidación más avanzado, y están relacionados con la oxidación del aceite, con el proceso de refinado o con ambos (Mendoza *et al.*, 1997).

La cuantificación de la luz absorbida, expresada en unidades específicas (extinción específica E1 cm 1 % es la extinción de una solución de la materia grasa al 1 % en el disolvente determinado, en un espesor de 1 cm), es lo que se conoce como índice K y queda legislado en el Reglamento 2568/91.

La determinación de  $\Delta K$  se utiliza como criterio de pureza para detectar mezclas con aceites refinados. En este proceso de refinado, se forman trienos conjugados que absorben también a 270 nm (o 268 nm). Dado que el  $\Delta K$  se determina como  $\Delta K = k_{268} - ((k_{264} + k_{272})/2)$ , en los aceites refinados este parámetro será mayor, mientras que los aceites de oliva de buena calidad y que han sido almacenados correctamente contienen pocos productos de oxidación que absorben a 270 nm.

En la siguiente tabla 4.12 se muestran los límites legislados establecidos de estos índices K para el AOVE y las tres DOPs analizadas en este trabajo.

**Tabla 4.12. Valores límite de los índices K según la legislación vigente.**

	<b>AOVE</b> (R. 2568/91 y USDA)	<b>DOP Les Garrigues</b> (R. 1902/2004)	<b>DOP Estepa</b> (Orden 4 de abril de 2011)	<b>DOP Sierra de Segura</b> (Orden de 4 de noviembre de 1993)
<b>K232</b>	≤ 2,50	-	-	-
<b>K270</b>	≤ 0,22	-	≤ 0,18	-
<b>DK</b>	≤ 0,01	-	-	-

-: no se exige un límite específico, estos aceites deben cumplir con los límites establecidos por el Reglamento 2568/91.

Todos los aceites de oliva analizados muestran un valor de K232 dentro de los requerimientos para poder ser considerados aceites de oliva virgen extra (tabla 4.13), cuyo límite es 2,5. Estos valores se han situado entre 1,92 y 2,19, siendo el aceite denominación de origen de la variedad Arbequina el que ha presentado el valor más bajo. El aceite DOP Hojiblanca ha mostrado el mayor índice K232 aunque con un valor muy similar al de Picual (2,19 Hojiblanca DOP y 2,16 Picual). Como ya se ha mencionado

anteriormente, tanto el K232 como el índice de peróxidos representan la oxidación primaria del aceite.

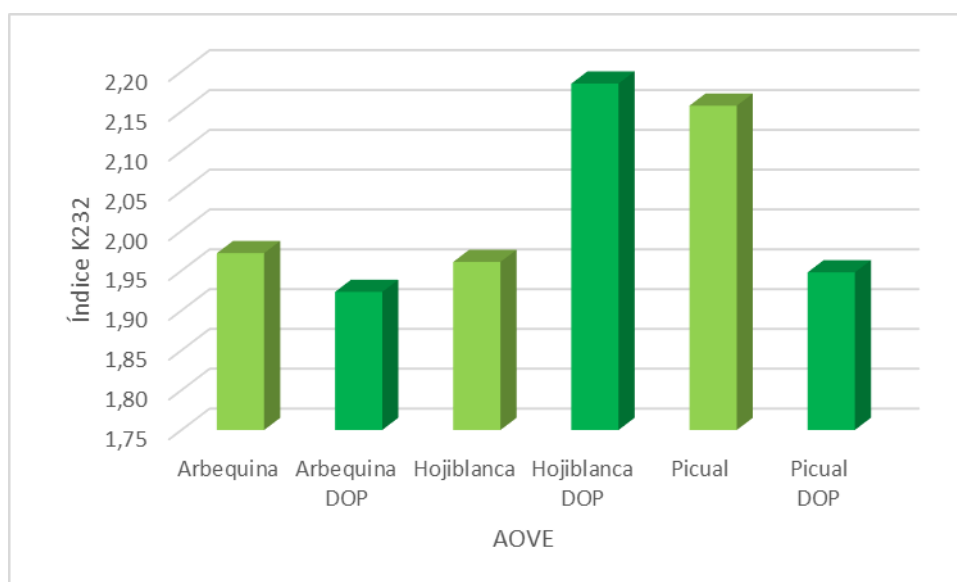
En la tabla que se representa a continuación (tabla 4.13) se muestran los resultados obtenidos de los índices K232, K268, K264, K272 y  $\Delta K$  este último calculado a partir de K268, K264 y K272.

**Tabla 4.13. Índices K de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

Código del producto	K232	K268	K264	K272	$\Delta K$
	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	
<b>Arbequina</b>	1,97 <sup>b</sup> $\pm$ 0,011	0,25 <sup>c</sup> $\pm$ 0,004	0,27 <sup>c</sup> $\pm$ 0,004	0,24 <sup>c</sup> $\pm$ 0,004	-0,005
<b>Arbequina DOP</b>	1,92 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	0,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	0,20 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	0,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	-0,003
<b>Hojiblanca</b>	1,96 <sup>a</sup> $\pm$ 0,009	0,22 <sup>b</sup> $\pm$ 0,009	0,23 <sup>b</sup> $\pm$ 0,009	0,22 <sup>b</sup> $\pm$ 0,009	-0,002
<b>Hojiblanca DOP</b>	2,19 <sup>c</sup> $\pm$ 0,008	0,28 <sup>d</sup> $\pm$ 0,004	0,29 <sup>d</sup> $\pm$ 0,004	0,26 <sup>d</sup> $\pm$ 0,003	-0,002
<b>Picual</b>	2,16 <sup>c</sup> $\pm$ 0,022	0,29 <sup>e</sup> $\pm$ 0,001	0,29 <sup>d</sup> $\pm$ 0,001	0,29 <sup>e</sup> $\pm$ 0,001	0,000
<b>Picual DOP</b>	1,95 <sup>a</sup> $\pm$ 0,006	0,23 <sup>b</sup> $\pm$ 0,001	0,24 <sup>b</sup> $\pm$ 0,001	0,22 <sup>b</sup> $\pm$ 0,002	-0,004

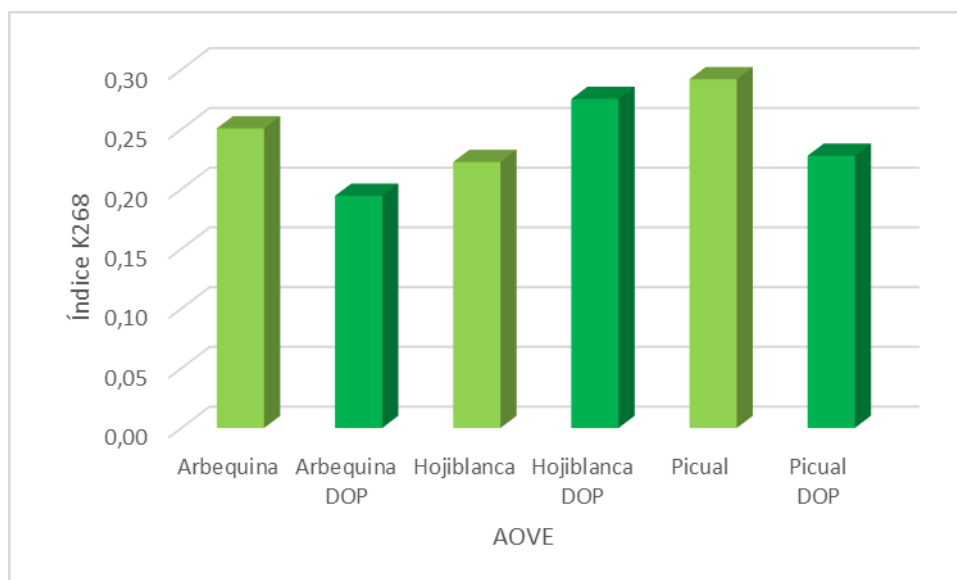
Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD) (n=3), las diferentes letras representadas como superíndice indican significación estadística ( $p < 0,05$ ).

En la siguiente figura 4.23 se muestran los resultados obtenidos del índice K232 para cada una de las variedades analizadas.



**Figura 4.23. Índices K232 de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

El valor de K268 que debería ser igual o inferior a 0,22, se sitúa por encima del valor límite establecido en el Reglamento 2568/91 y por el COI en cuatro de los aceites considerados en este trabajo. Los dos aceites que muestran un valor por debajo del establecido por la reglamentación son el aceite de oliva virgen extra DOP de la variedad Arbequina con un índice K268 de 0,19 (esta DOP no tiene un requerimiento especial para este valor de K268, con lo que el valor establecido es el mismo que para los aceites de oliva virgen extra sin denominación de origen, es decir, 0,22) y el AOVE sin DOP de la variedad Hojiblanca (K268=0,22) (tabla 4.13 y figura 4.24). En el AOVE de la variedad Picual se ha detectado el mayor valor de K268 (0,29), valor casi idéntico al presentado por Hojiblanca DOP (0,28). Estas pequeñas fluctuaciones son generalmente admitidas debido a una evolución natural de la vida útil del aceite.



**Figura 4.24. Índices K 268 de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

En cuanto al valor  $\Delta K$ , calculado de la siguiente forma:  $\Delta K = K268 - ((K264 + K272)/2)$ , todos los aceites cumplen los requerimientos, mostrando unos valores inferiores a 0,01. Esto indica, que a pesar de los resultados algo elevados de K268, los aceites analizados en este estudio son aceites de oliva virgen de buena calidad y que han sido almacenados correctamente.

Como hemos indicado, el aceite que ha presentado unos valores de los índices K más bajos, y por tanto, mayor estabilidad, ha sido el aceite de variedad Arbequina denominación de origen. Este hecho puede deberse a que esta variedad, al ser algo más delicada por su composición, requiere una elaboración más cuidadosa, lo que puede estar relacionado con un menor grado de oxidación.

De esta manera, los valores más bajos de los parámetros K obtenidos en este trabajo, tanto K232 como K268, han correspondido al aceite de la variedad Arbequina DOP, y los valores más elevados de ambos parámetros a las variedades Hojiblanca DOP y Picual.

Los resultados obtenidos del índice K232 son similares a los indicados por Gutiérrez *et al.* (2002) en el aceite de la variedad Arbequina, mientras que son algo superiores en el caso de los AOVE de las variedades Hojiblanca y Picual. Los valores de K270 fueron inferiores a



los descritos en este trabajo en las tres variedades analizadas. Otros autores como Gimeno *et al.* (2002), y Dabbou *et al.* (2010), publicaron valores inferiores de los índices K en AOVE de las variedades Arbequina DOP Les Garrigues (0,11) y Arbequina (1,41) respectivamente.

Entre las causas de la variabilidad de resultados obtenidos entre las muestras puede destacarse, por un lado, el envase en el que se encuentran contenidos los aceites, y por otro, el tiempo de almacenamiento. En un estudio llevado a cabo por Méndez y Falqué (2007), los parámetros físico-químicos analizados en las distintas muestras de aceite de oliva virgen extra al comienzo del estudio se encontraron dentro de los límites establecidos por la legislación pero sufrieron variaciones a lo largo del tiempo de almacenamiento y en función del envase empleado. Como ya se ha comentado anteriormente, la principal causa de deterioro del aceite de oliva virgen extra durante el almacenamiento son las reacciones de oxidación y de hidrólisis y los productos resultantes de éstas, la pérdida de antioxidantes naturales y la variación del contenido de pigmentos naturales con lo que se observa un aumento en el grado de acidez, índice de peróxidos e índices K. Con respecto al tipo de envase, se ha visto que el envase tradicional (botella de plástico) no es de los más adecuados, ya que con el tiempo (al cabo de unos 3 meses en el estudio realizado por Méndez y Falqué (2007)), el aceite pierde estabilidad comparando con otros envases, como consecuencia de la acción del oxígeno y la luz.

Méndez y Falqué (2007) encontraron valores más elevados del coeficiente K<sub>232</sub> en los aceites de oliva envasados en botellas de plástico que en envases de cristal o plástico opaco. Esto puede ser debido a la acción conjunta de la luz y la permeabilidad de este tipo de envase al oxígeno, que cataliza la reacción de oxidación. Además, este estudio mostró que después de 3 y 6 meses de almacenamiento se producía un aumento en la cantidad de ácidos grasos libres en todos los aceites, aunque de forma menos marcada en los aceites contenidos en envases de plástico opaco y hojalata. En el presente estudio se observa, como ya se ha comentado, y de acuerdo al estudio de Méndez y Falqué (2007), que la acidez es mayor en los aceites envasados en plástico transparente que en vidrio opaco a excepción del AOVE sin DOP de la variedad Arbequina, envasada en vidrio verde y

con un elevado grado de acidez. Por el contrario, no se observa relación entre el índice K232 y el envase, ya que algunos aceites contenidos en botella de vidrio presentan valores más elevados que otros envasados en botella de plástico transparente. Sí que hay que destacar que el aceite de oliva que ha presentado un índice K (tanto K232 como K270) menor ha sido la DOP de la variedad Arbequina, envasada en botella de vidrio verde.

En el estudio de Caponio *et al.* (2005) se analizaron distintos aceites almacenados en condiciones de luz u oscuridad. Se observó que las muestras expuestas a la luz mostraron niveles más bajos de peróxidos que las que se mantuvieron en oscuridad, lo cual puede ser atribuido a la evolución de la oxidación primaria a la secundaria. Esto se confirma con los valores de K232 y K270. Las muestras almacenadas en oscuridad mostraron valores de K232 mayores que las expuestas a la luz, lo que significa que en la oscuridad, los dienos conjugados, que absorben a 232 nm, fueron los productos presentes en mayor cantidad. El valor de K270 en las muestras almacenadas en oscuridad se mantuvo casi sin cambios. Por el contrario, los aceites expuestos a la luz mostraron unos valores de K270 mayores, lo que está relacionado con la presencia de compuestos de la oxidación secundaria que contienen un grupo carbonilo. Esto indica, como ya se había mencionado previamente, que la exposición a la luz favorece la degradación de los compuestos de la oxidación primaria, apareciendo nuevos productos de oxidación secundaria. Estos datos sugieren que la luz es la principal causa del aumento de absorbancia a 270 nm. Además, transcurridos cuatro meses de almacenamiento de las muestras de AOVE, el valor de K270 de los aceites expuestos a la luz excedieron los límites establecidos por el Reglamento 2568/91.

Con todo lo explicado previamente, que los valores obtenidos del parámetro K268 en la presente Tesis Doctoral sean superiores a los indicados por la legislación puede deberse, entre otros, al tiempo de almacenamiento transcurrido desde la elaboración del aceite hasta el análisis. Por una parte, las muestras se adquirieron en una gran superficie pudiendo haber transcurrido varias semanas desde su elaboración/envasado; por otra parte, se analizaron tras cuatro meses de almacenamiento después de haberse adquirido,

y aunque se mantuvieron guardadas en condiciones de oscuridad, se exponían a la luz con cada toma de muestra. Estas situaciones han podido contribuir a la formación de compuestos de oxidación secundaria a partir de los productos de la oxidación primaria, de ahí que aunque el índice de peróxidos y el K232 se sitúan por debajo del límite, el K270 es superior a lo legislado.

Los resultados aquí descritos muestran que existe una variabilidad del K268 probablemente debida a la propia evolución natural del AOVE, por lo que sería conveniente indicar el tiempo máximo de almacenamiento de los aceites de oliva virgen para que en todo momento antes del consumo, mantengan la calidad exigible.

Otra posible causa que podría explicar los elevados índices K puede estar relacionada con el proceso de extracción del aceite. El trabajo de Motilva *et al.*, 1998 se centra en la caracterización de los aceites de DOP Les Garrigues. En su trabajo, obtienen valores del grado de acidez y del índice de peróxidos dentro de las especificaciones del Reglamento, sin embargo se observa una gran variabilidad en el índice K270, que fluctúa entre valores de 0,09 y 0,29, valor que supera la Reglamentación de la DOP para este parámetro (máximo 0,22). Esta variabilidad no estaba asociada a factores climatológicos o geográficos, sino que podría estar relacionada con las condiciones del proceso de extracción del aceite, en especial con las altas temperaturas aplicadas en algunas almazaras para aumentar el rendimiento en molturación, lo que puede tener como consecuencia la aparición en el aceite de compuestos secundarios de oxidación.

En los parámetros de calidad también tiene una influencia significativa el grado de maduración del fruto. En el estudio de Gutiérrez *et al.* (1999) se observó un ligero incremento en la acidez a lo largo del proceso de maduración causado por la activación de enzimas lipolíticas presentes en el fruto. El índice de peróxidos descendió durante la maduración debido a una disminución en la actividad de la enzima lipooxigenasa. Los valores de K232 y K270 fueron disminuyendo durante la maduración en algunas variedades.

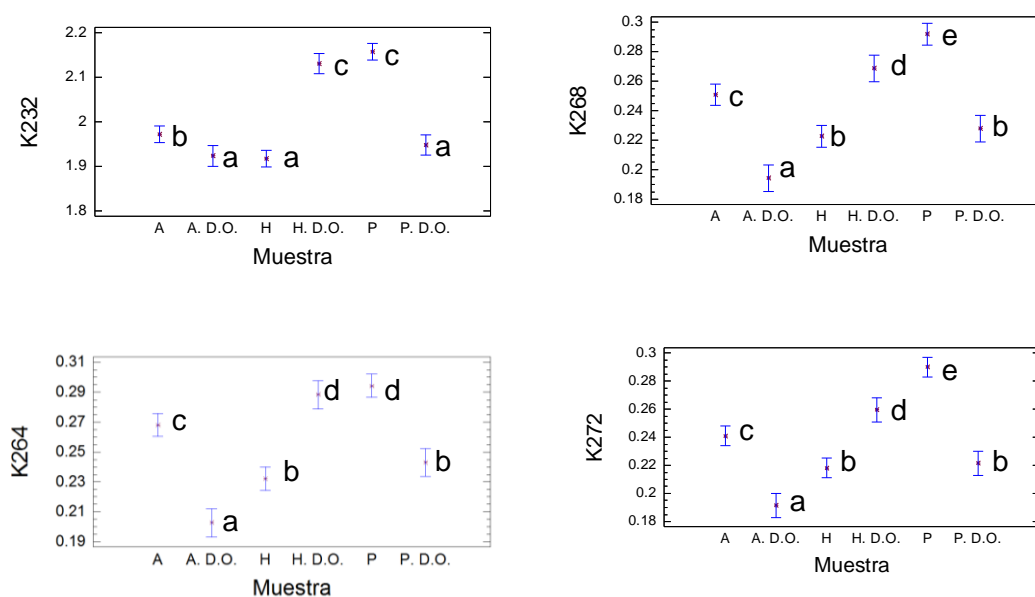
En el presente trabajo, con los datos obtenidos, no se puede establecer una relación clara de estos índices K con el tipo de envase o la variedad, sin embargo, sí se puede decir que la variedad Arbequina DOP, envasada en botella de vidrio verde, es la que presenta los valores de ambos índices K más bajos y dentro de los límites establecidos. Este hecho se puede asociar a que se trata de un aceite denominación de origen protegida y que se encontraba almacenada en un envase más adecuado para evitar la oxidación, con un índice K inferior a los otros aceites que no presentaban estas características.

En cuanto a los resultados estadísticos, se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras al estudiar los índices K entre los aceites comerciales incluidos en el estudio (figura 4.25). Sin embargo, al aplicar el test de Tukey, a diferencia de los resultados obtenidos en el análisis del grado de acidez y del índice de peróxidos donde se distinguían claramente dos grupos, uno que incluía los aceites DOP y el otro los aceites sin DOP, en el análisis de los índices K estos dos grupos no se encuentran bien diferenciados.

Al analizar los valores de K232 se aprecia un grupo homogéneo que incluye los AOVE Arbequina DOP, Picual DOP, y Hojiblanca (sin DOP) y otro con los AOVE Hojiblanca DOP y Picual. En cuanto al valor K268 se ha obtenido un grupo homogéneo correspondiente a los aceites Picual DOP y Hojiblanca. En el grupo que incluye los tres AOVE con menor índice K232 se encuentran las denominaciones de origen de los aceites de las variedades Arbequina y Picual, lo que demuestra que se trata de aceites de calidad superior. En cuanto al índice K268 se observa que de nuevo estas dos denominaciones de origen presentan valores más bajos comparándolas con el resto.

De nuevo, el aceite de la variedad Arbequina presenta diferencias estadísticamente significativas con el resto de aceites en cuanto a los dos índices K232 y K268.

Por otra parte, analizando las gráficas representadas en la figura 4.25, se puede observar que las muestras se distribuyen siguiendo un perfil similar, es decir, que aquellas muestras con valores elevados (o bajos) de K232 poseen valores elevados (o bajos) en el K268, K264 y K272.



**Figura 4.25. Gráficas de medias de los índices K.** Test de ANOVA univariante y test de Tukey.

(Letras diferentes significan variaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ). (A: Arbequina, A.D.O: Arbequina DOP, H: Hojiblanca, H.D.O: Hojiblanca DOP, P: Picual, P.D.O: Picual DOP).

#### 4.5.2. OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD: DIACILGLICÉRIDOS Y POLIFENOLES TOTALES

##### Análisis del contenido de diacilglicéridos

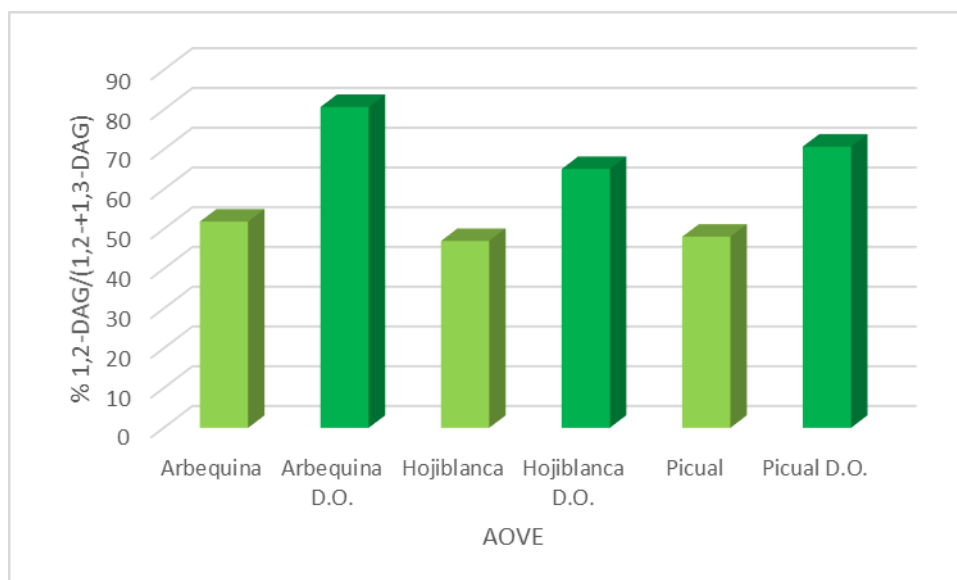
El análisis de DAGs es un parámetro útil para evaluar la frescura y el origen de un aceite, incluso de un aceite refinado ya que el contenido de DAGs de un aceite de oliva virgen es diferente de un aceite con una acidez elevada o extraído con disolventes. De forma general, el aceite de oliva virgen extra fresco contiene una elevada proporción de 1,2-DAGs respecto al total de 1,2- y 1,3- DAGs, mientras que el aceite de oliva virgen extra procedente de aceitunas de baja calidad y aceites de oliva refinados poseen una cantidad de 1,3-DAGs superior. Este ratio de los isómeros 1,2- con respecto a la suma de los 1,2- y 1,3-DAGs indica si el aceite está hidrolizado, oxidado, es de baja calidad, y/o ha sido adulterado con aceite refinado.

El análisis de DAGs no es considerado un parámetro de calidad por la Unión Europea ni por el United States Department of Agriculture (USDA), pero sí por la Australian Olive Association (AOA) y la German Society for Fat Science (DGF). Estas entidades establecen que los aceites de oliva virgen extra deben poseer una cantidad de 1,2-diacilglicéridos con respecto al total (suma de 1,2- y 1,3-) igual o superior al 40%.

Como se observa en la siguiente tabla 4.14 y figura 4.26 donde se muestran los resultados obtenidos de los análisis de las distintas muestras, todos los aceites de oliva virgen extra analizados cumplen los requerimiento legales de estas entidades ya que la relación 1,2-DAGs/total de 1,2- y 1,3-DAGs es superior al 40% en todos los AOVE analizados. Asimismo, se puede observar que los aceites denominación de origen poseen una proporción de 1,2- diacilglicéridos con respecto al total, superior al de los aceites sin denominación de origen. También cabe destacar que los aceites elaborados con la variedad Arbequina (DOP y sin DOP) muestran un porcentaje superior, siendo, por otro lado, el aceite de variedad Hojiblanca el de menor relación, aunque siempre dentro de los límites establecidos. Nuevamente, la variedad Arbequina DOP muestra menor alteración.

**Tabla 4.14. Porcentaje de 1,2- DAGs /total de 1,2- y 1,3- DAGs de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

<b>Código del producto</b>	<b>%1,2-DAGs/TOTAL (1,2- + 1,3-DAGs)</b>
Arbequina	51,89
Arbequina DOP	80,72
Hojiblanca	47,02
Hojiblanca DOP	65,11
Picual	48,08
Picual DOP	70,75



**Figura 4.26. Porcentaje de 1,2- diacilglicéridos /total 1,2- y 1,3- diacilglicéridos de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

Caponio *et al.* (2013) analizaron mediante cromatografía de gases el contenido de DAGs en dos variedades de aceites de oliva virgen extra a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Se encontraban envasadas en botellas de vidrio transparente/verde y almacenadas en condiciones de luz/oscuridad. Se observó que el ratio 1,2-DAGs/ total DAGs estaba influido por el tiempo en mayor grado que por las condiciones de almacenamiento. A tiempo cero, los 1,2-DAGs se encontraban en bastante mayor cantidad, con un porcentaje sobre el total de más del 80%. A lo largo del tiempo, este porcentaje fue disminuyendo y aumentando la cantidad de 1,3-DAGs, debido a la isomerización desde la posición 1,2 a la posición 1,3, formándose el isómero más estable. Estos resultados están acordes con los obtenidos en un aceite de oliva virgen extra de la variedad Picual por Pérez-Camino *et al.* (2001). Por otra parte, en estos estudios se ha visto que el proceso de isomerización es más rápido durante los primeros meses de almacenamiento. Pérez-Camino *et al.* (2001) indicaron que la evolución de los DAGs y el ratio 1,2-DAGs/1,3-DAGs era función del tiempo de almacenamiento, temperatura y el grado de acidez. Estos investigadores observaron que la isomerización del 1,2-DAGs a 1,3-DAGs ocurría a más velocidad con el incremento de la temperatura y la acidez libre.

Los resultados de Cossignani *et al.* (2007) mostraron que la temperatura tiene una gran influencia sobre el grado de isomerización; de hecho, observaron que afectaba en mayor medida en la composición de los DAGs que el tiempo en que los aceites permanecieron almacenados.

Las muestras de este trabajo que presentaron un porcentaje de 1,2-DAGs respecto al total más elevado fueron los aceites de oliva virgen DOP, contenidos en vidrio verde o marrón, con lo que estaban más protegidos de la acción de la luz. También Arbequina sin DOP, contenida en vidrio verde presentó valores más elevados de 1,2-DAGs si lo comparamos con las otras variedades sin DOP, envasadas en plástico transparente. Además, se mantuvieron almacenadas durante 4 meses tras su adquisición en las mismas condiciones de oscuridad y a la misma temperatura, con lo que el tipo de envase que contenía el aceite pudo jugar un papel esencial en su conservación.

Por otra parte, la hidrólisis de los TAGs puede afectar a la cinética de isomerización de los DAGs incrementando la concentración de DAGs y ácidos grasos libres. La hidrólisis de los TAGs y la isomerización de los DAGs se acelera en aquellos aceites de oliva que poseen mayor acidez (Spyros *et al.*, 2004). Esto implica que los ácidos grasos libres actúan como catalizadores en ambos procesos. Con los resultados indicados por estos autores se podría predecir que en los AOVE analizados en el presente estudio que presentan un grado de acidez más elevado se favorecería el aumento de los 1,3-DAGs con respecto a los 1,2-DAGs. En concreto, esta isomerización sería más notable en el aceite de oliva virgen extra de la variedad Arbequina ya que es la que mayor grado de acidez ha presentado.



### **Análisis del contenido de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles en el aceite de oliva virgen extra no es un parámetro de calidad considerado por la legislación vigente ni el COI; sin embargo, estos compuestos actúan como antioxidantes inhibiendo la oxidación del aceite aumentando de esta forma su tiempo de vida útil y mejorando su calidad. Son también indicadores del tiempo de almacenamiento, ya que la cantidad de polifenoles decrece con el tiempo.

Los numerosos estudios que se han realizado y que se están realizando que ponen de manifiesto los beneficios que estos compuestos tienen sobre la salud, hacen que el conocimiento del contenido de polifenoles sea de gran interés tanto para la industria como para el consumidor.

El cultivar, el sistema de extracción (sistema de centrifugación, temperatura de batido, cantidad de agua añadida, etc.) y las condiciones de procesamiento, empaquetamiento, distribución y almacenamiento son factores críticos que afectan a la cantidad final de polifenoles en el aceite (Motilva *et al.*, 1998; Boskou 2006a).

En la tabla 4.15 se muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo del contenido de polifenoles totales determinados por espectrofotometría, medidos a una longitud de onda de 725 nm y expresados en mg de ácido cafeico /kg de aceite, en cada una de las muestras de aceite de oliva virgen extra, y en la figura 4.27 la representación gráfica de los datos. Estos valores se encuentran en un rango entre 122,970 y 356,177 mg de ácido cafeico /kg de aceite y coinciden con los indicados en la bibliografía donde se indican valores de contenido total de polifenoles comprendidos entre 50 y 1000 mg de polifenoles/ kg de aceite, y en otros estudios entre 100 y 300 mg/ kg (Tsimidou, 1998).

**Tabla 4.15. Contenido medio de polifenoles totales (mg ácido cafeico /kg de aceite) de los aceites de oliva virgen extra analizados.**

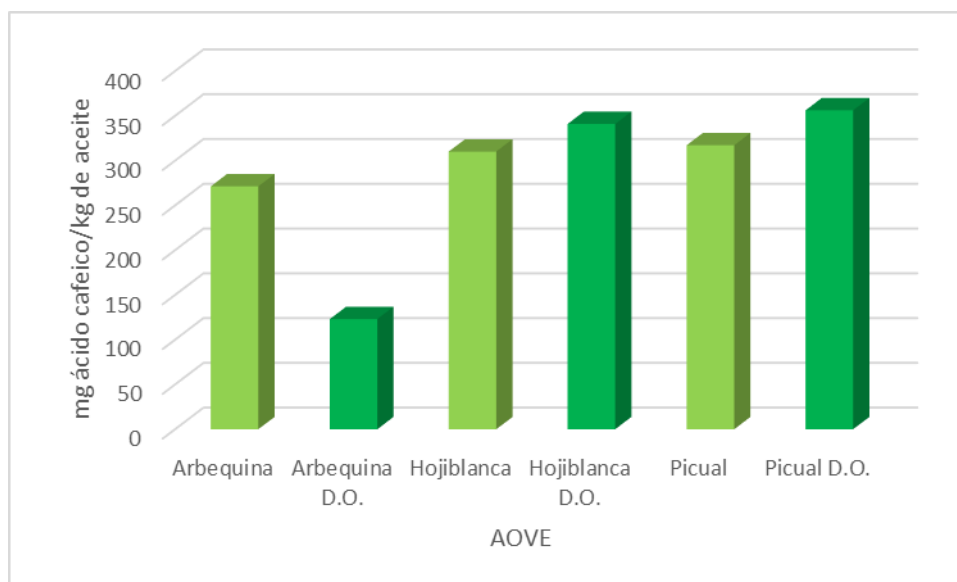
<b>Código del producto</b>	<b>POLIFENOLES TOTALES (725 nm)</b> (Media $\pm$ SD)
<b>Arbequina</b>	271,270 <sup>a</sup> $\pm$ 4,14
<b>Arbequina DOP</b>	122,970 <sup>b</sup> $\pm$ 2,75
<b>Hojiblanca</b>	310,085 <sup>c</sup> $\pm$ 6,13
<b>Hojiblanca DOP</b>	340,924 <sup>c</sup> $\pm$ 3,73
<b>Picual</b>	317,098 <sup>c</sup> $\pm$ 3,99
<b>Picual DOP</b>	356,177 <sup>c</sup> $\pm$ 2,56

Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD) (n=3), las diferentes letras representadas como superíndice indican variaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Se puede apreciar que los aceites de la variedad Arbequina, tanto el aceite con DOP como sin DOP, especialmente este último, presentan valores notablemente inferiores a los de las otras dos variedades. El AOVE DOP de la variedad Picual ha sido el aceite con mayor cantidad de estos compuestos, detectándose un valor superior al resto de aceites.

Las referencias bibliográficas consultadas en las que se ha analizado el contenido de polifenoles de las **variedades** Arbequina, Picual y Hojiblanca utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm y expresando los resultados también en mg ácido cafeico /kg de aceite, indican, al igual que en el presente trabajo, que la variedad catalana presenta menor cantidad de compuestos fenólicos que las variedades Hojiblanca y Picual (Aparicio y Luna, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002; Gorinstein, *et al.*, 2003). Lo mismo ocurre con el AOVE DOP Les Garrigues de la variedad Arbequina, donde estudios demuestran que el contenido de polifenoles en estos AOVE (cuantificados mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y expresados en ppm de

ácido cafeico) es bajo, con unos valores medios de 152,4 ppm y un rango entre 82,4 y 304,6 ppm, lo que contribuye a que su estabilidad sea también relativamente baja (Motilva *et al.*, 1998).



**Figura 4.27. Polifenoles totales cuantificados mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 725 nm en los AOVE analizados.**

En cuanto a las diferencias que pueden detectarse en el contenido total de estos compuestos debido al **grado de maduración** de la aceituna, Franco *et al.* (2013), analizaron el contenido total de polifenoles en dos aceites de oliva de las variedades Arbequina y Picual utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (absorbancia determinada a 725 nm y resultados expresados en mg ácido cafeico/kg de aceite). Estos autores concluyeron que la cantidad de polifenoles totales depende tanto de la variedad de aceituna (Arbequina contiene menos polifenoles que Picual) como del grado de maduración de la aceituna (el contenido de polifenoles desciende al aumentar la maduración del fruto) con valores que oscilan entre 160 y 419 en variedades maduras y 409 y 671 en variedades con un grado de maduración menos elevado, en los aceites Arbequina y Picual respectivamente. Otros autores como Gimeno *et al.* (2002) y Gutiérrez *et al.* (1999) muestran también que los aceites obtenidos de frutos más

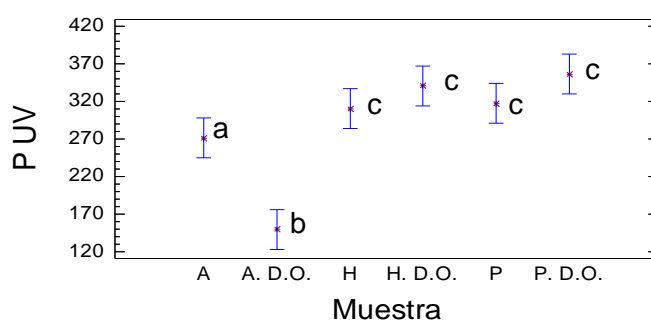
maduros contienen menos cantidad de polifenoles que los obtenidos a partir de frutos en un estadio de maduración menos avanzado.

En diversas fuentes bibliográficas se muestra también que el **método de extracción del aceite** de oliva virgen tiene influencia en la cantidad de polifenoles finales. Gimeno *et al.* (2002) analizaron los polifenoles en un aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina de la DOP Les Garrigues mediante espectrofotometría a 765 nm utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Sus resultados indican que los aceites obtenidos en decantadores de dos fases tienen unas concentraciones significativamente más altas en compuestos fenólicos que los obtenidos en decantadores de tres fases. Esto es debido a que la adición de agua en el método de la decantación de tres fases retira los fenoles del aceite ya que éstos son polares.

Otro de los factores determinantes en la cantidad total de polifenoles, al igual que en los demás parámetros analizados hasta ahora, es el **tiempo de almacenamiento**. En el trabajo de Del Caro *et al.* (2006) analizaron el contenido total de polifenoles en un aceite de oliva virgen usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Determinaron la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm y expresaron los resultados en mg de ácido gálico /kg de aceite. Observaron un descenso de alrededor del 40% en el contenido de polifenoles en el aceite de oliva virgen analizado al cabo de 16 meses de almacenamiento.

En el presente estudio, las muestras se almacenaron durante cuatro meses antes de realizar la determinación de polifenoles, con lo que probablemente la cantidad inicial fuera superior a la obtenida en el momento de los análisis. Por otra parte, se desconoce cómo han podido influir factores como las condiciones de cultivo, el grado de maduración en que se encontraban las aceitunas en el momento de la recolección y el método de extracción del aceite en la cantidad de polifenoles presentes en los aceites de oliva virgen analizados. Por el contrario, sí es posible indicar que la cantidad de polifenoles en un AOVE está altamente relacionada con la variedad de la aceituna, como se ha mencionado en los estudios citados previamente, siendo elevada en Picual y más baja en Arbequina.

Al realizar el test estadístico ANOVA, se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ) (figura 4.28). Se distinguen tres grupos homogéneos entre las medias, uno lo forma el AOVE DOP de la variedad Arbequina, otro el aceite de la misma variedad sin DOP, y otro formado por los demás AOVE del estudio.



**Figura 4.28. Gráficas de medias del contenido de polifenoles por espectrofotometría**

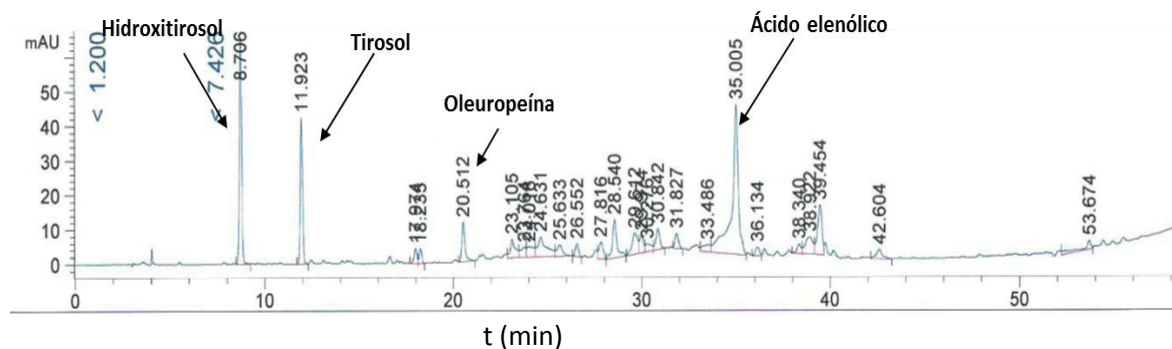
**(PUV).** Test de ANOVA univariante y test de Tukey. (Letras diferentes significan variaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ). (A: Arbequina, A.D.O: Arbequina DOP, H: Hojiblanca, H.D.O: Hojiblanca DOP, P: Picual, P.D.O: Picual DOP).

De esta gráfica se desprende que el contenido de polifenoles es más bajo en los aceites de las variedades Arbequina, especialmente en el AOVE DOP de esta variedad, que en el resto de aceites, los cuales muestran un contenido de polifenoles similar. Por otra parte, dentro del grupo de aceites de las variedades Picual y Hojiblanca, el contenido de polifenoles totales es algo superior en los aceites con denominación de origen protegida.

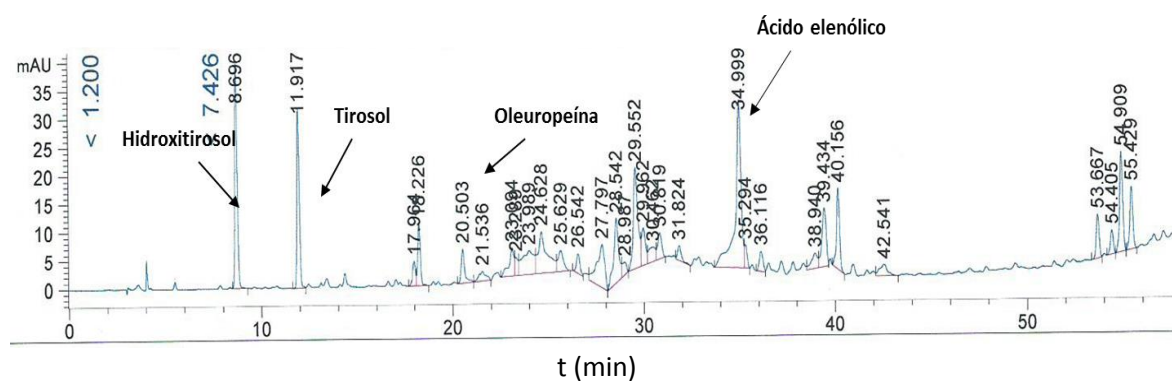
Con el fin de obtener resultados más pormenorizados y específicos se procedió al análisis del contenido de polifenoles de las seis muestras comerciales de AOVE de calidad comercial y calidad diferenciada mediante HPLC. Los compuestos que han sido identificados y cuantificados han sido el tirosol, hidroxitirosol, el ácido elenólico y la oleuropeína.

En la siguiente figura 4.29 se muestran los perfiles cromatográficos de tres de las muestras de aceite de oliva virgen extra analizadas en la presente Tesis.

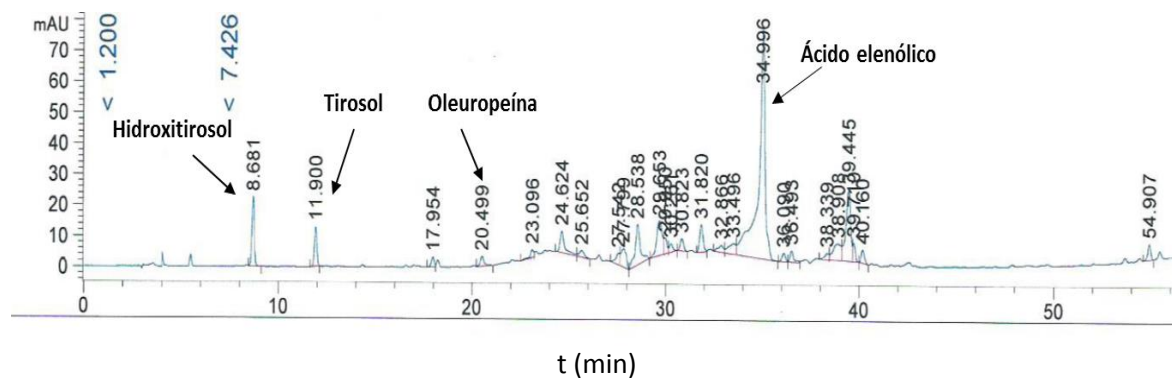
A:



B:



C:



**Figura 4.29. Perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC de los polifenoles en los AOVE DOP a 280 nm. A: Hojiblanca DOP. B: Arbequina DOP. C: Picual DOP.**

En la siguiente tabla 4.16 se expresan los resultados obtenidos por HPLC en las diferentes muestras.

**Tabla 4.16. Contenido de tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína, ácido elenólico y polifenoles totales de los AOVE analizados por HPLC.**

<b>Código del producto</b>	<b>TIROSOL*</b>	<b>HIDROXITIROSOL*</b>	<b>OLEUROPEÍNA*</b>	<b>ÁCIDO ELENÓLICO*</b>	<b>TOTAL**</b>
<b>ARBEQUINA</b> (Vidrio verde)	55,892 ± 1,863	41,252 ± 1,982	56,584 ± 1,902	283,165 ± 21,022	436,893 ± 26,769
<b>ARBEQUINA DOP</b> (Vidrio verde)	29,450 ± 1,763	16,013 ± 1,895	39,786 ± 0,474	76,935 ± 21,413	162,185 ± 24,597
<b>HOJIBLANCA</b> (plástico transparente)	63,23 ± 0,823	55,847 ± 0,263	48,383 ± 0,722	406,781 ± 17,044	574,241 ± 16,883
<b>HOJIBLANCA DOP</b> (vidrio marrón)	44,244 ± 4,109	42,217 ± 6,139	78,788 ± 2,957	387,557 ± 92,559	552,806 ± 99,850
<b>PICUAL</b> (Plástico transparente)	50,504 ± 5,030	33,527 ± 4,129	41,585 ± 3,381	253,395 ± 62,852	379,011 ± 75,391
<b>PICUAL DOP</b> (vidrio verde)	36,365 ± 0,280	28,739 ± 0,168	45,359 ± 0,336	568,373 ± 63,529	678,835 ± 63,418

\* Datos expresados en mg/kg de aceite.

\*\*Calculado mediante suma de concentraciones del tirosol, HT, oleuropeína y ácido elenólico y expresado en mg/kg de aceite.

Para realizar la cuantificación de los polifenoles mediante HPLC, se ha interpolado el área obtenida de cada uno de los tres compuestos en la recta de regresión de sus patrones correspondientes, indicadas en las figuras 4.17 y 4.18. Los resultados se han expresado en mg de compuesto (tiroso, hidroxitiroso u oleuropeína según corresponda) por kilogramo de aceite. El ácido elenólico se ha calculado utilizando la curva de calibrado de la oleuropeína a 240 nm, expresándose los resultados en mg de ácido elenólico/kg de aceite (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2007). Por otra parte, el contenido total de polifenoles cuantificado por HPLC se ha calculado mediante la suma de las concentraciones de los cuatro compuestos cuantificados (tiroso, hidroxitiroso, oleuropeína y ácido elenólico) (mg/kg de aceite). También se ha calculado el contenido total mediante la suma de las áreas de estos compuestos expresados en equivalentes de tiroso. Los resultados y la discusión se indicarán más adelante.

En la tabla 4.16 se puede observar que las cantidades cuantificadas de tiroso e hidroxitiroso han sido superiores en el aceite de oliva virgen extra de la variedad Hojiblanca, el contenido de oleuropeína ha sido más elevado en el AOVE de la variedad Hojiblanca DOP y el ácido elenólico en el AOVE de la variedad Picual DOP. En cuanto a la cantidad de polifenoles totales cuantificados mediante la suma de concentraciones, el aceite con más cantidad total ha sido, al igual que la obtenida mediante espectrofotometría, el AOVE DOP de la variedad Picual. Por otro lado, el AOVE DOP de la variedad Arbequina ha presentado menor cantidad de cada uno de los compuestos fenólicos, y también, como es lógico, un contenido total calculado mediante suma de concentraciones inferior, hecho que concuerda con los datos obtenidos al cuantificar los polifenoles totales mediante espectrofotometría.

Es interesante señalar que el área cuantificada del ácido elenólico (EA) mediante análisis cromatográfico representa alrededor del 20% de todas las áreas de los picos detectados (figura 4.29), siendo este compuesto, que se forma por hidrólisis de la oleuropeína (3,4-DHPEA-EA), el mayoritario en todas las muestras de aceite analizadas. Entre los distintos fenoles simples identificados en el estudio realizado por Morelló *et al.* (2004), se observó una disminución significativa en la concentración de los compuestos fenólicos que fue



más marcada en los derivados secoiridoides, 3,4-DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA, indicando una participación más activa en los procesos de oxidación ya que se oxidaron con más facilidad, aumentando el hidroxitirosol, tirosol y ácido elenólico debido a que se producen por hidrólisis de los anteriores. Es necesario señalar que el ácido elenólico, aunque se considera dentro del grupo de los compuestos fenólicos, no es un polifenol propiamente dicho porque carece de anillo fenólico y además muestra una menor capacidad antirradicalaria (Valli *et al.*, 2010).

Dependiendo de la variedad de aceituna, el contenido de polifenoles es diferente tanto en la cantidad total, como se ha visto previamente al discutir los resultados obtenidos mediante espectrofotometría, como en la cantidad de compuestos fenólicos individuales. Autores como Lozano-Sánchez *et al.* (2010) indican, al igual que en el presente estudio, resultados variables en el contenido de polifenoles totales e individuales dependiendo de la variedad del AOVE.

Existen diferentes técnicas de extracción, condiciones cromatográficas y métodos de cuantificación que hace que existan grandes diferencias en la cantidad de polifenoles determinados por distintos autores. Algunos científicos explican la disparidad de los resultados obtenidos debido a los diversos factores que contribuyen a la variación del contenido de los compuestos fenólicos, como el grado de maduración de la aceituna, o las modificaciones tecnológicas durante el procesado, aunque no se debe únicamente a estos factores. Pirisi *et al.* (2000) explican que las discrepancias pueden ser causadas por los diferentes métodos analíticos utilizados y/o porque la expresión de los resultados no se hace siempre de la misma manera. Así, en este trabajo se analizan y discuten los resultados obtenidos mediante las dos técnicas analíticas por separado, ya que se trata de dos técnicas diferentes y las cantidades obtenidas no se expresan de igual manera. Incluso utilizando el mismo método, como en el caso del método espectrofotométrico mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, se pueden obtener resultados diferentes en función de la forma de expresar los resultados (ácido cafeico, gálico, equivalentes de oleuropeína...). Tan grandes pueden llegar a ser estas diferencias que la concentración

total de los polifenoles contenidos en el mismo aceite puede variar entre el 18 y 80%, dependiendo de la forma de expresar las cantidades (Pirisi *et al.* 2000).

A pesar de estas diferencias, que también se ponen de manifiesto en el presente trabajo, donde el contenido total obtenido por las técnicas de espectrofotometría y HPLC son claramente distintas, se puede apreciar que los polifenoles totales cuantificados en el AOVE de la variedad Arbequina DOP mediante los dos métodos analíticos es considerablemente inferior al resto de variedades. Con lo cual, aunque generalmente no es útil la comparación entre estas dos técnicas, ambas nos indican que existen claras diferencias entre el contenido de polifenoles en el AOVE de la variedad Arbequina y el resto de aceites.

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se ha realizado también mediante la suma de las áreas de todos los picos obtenidos mediante el método de HPLC. Los resultados se interpolaron en la recta de regresión del tirosol, y los resultados se expresaron en equivalentes de tirosol (tabla 4.17).

**Tabla 4.17. Contenido de polifenoles totales expresados en equivalentes de tirosol.**

<b>Código del producto</b>	<b>Polifenoles totales (mg/kg de aceite)</b>
<b>Arbequina</b>	536,046 ± 44,136
<b>Arbequina DOP</b>	544,943 ± 79,268
<b>Hojiblanca</b>	491,277 ± 20,212
<b>Hojiblanca DOP</b>	531,102 ± 119,236
<b>Picual</b>	238,552 ± 52,781
<b>Picual DOP</b>	445,764 ± 52,573

Cabe destacar que el número de picos obtenidos por HPLC en el AOVE de la variedad Picual ha sido menor que en cualquiera de las otras variedades, siendo además el contenido de polifenoles totales calculado mediante la suma de las áreas de cada uno de los picos bastante inferior al resto de los aceites analizados.

Autores como García *et al.* (2003) analizaron la cantidad de polifenoles en aceites de oliva virgen de las variedades Cornicabra, Picual, Arbequina y Hojiblanca mediante HPLC. En su trabajo, las variedades Cornicabra y Picual presentaron un mayor contenido de polifenoles, y la variedad Arbequina la que menor cantidad mostró tanto de polifenoles totales como individuales. Estos autores también calcularon el contenido total como la suma de las concentraciones de los diferentes polifenoles, obteniendo unos valores de 334 mg/kg de aceite en la variedad Arbequina, 400 mg/kg de aceite en Picual y 355 mg/kg de aceite en Hojiblanca. Gómez-Rico *et al.* (2008) cuantificaron los compuestos fenólicos mediante HPLC en aceites de oliva virgen de las variedades Arbequina y Picual entre otros. El contenido de hidroxitirosol y tirosol fue también bastante inferior en el AOVE de la variedad Arbequina a la cuantificada en la variedad Picual, y en cuanto al contenido de polifenoles totales, estos autores indicaron unos valores de 244 mg/kg de aceite en la variedad Arbequina y 892 mg/kg de aceite en la variedad Picual; es decir, que al igual que en la presente Tesis, en ambos estudios el AOVE de la variedad Picual presentó unos valores superiores a los del aceite de la variedad Arbequina (especialmente Arbequina DOP en este trabajo) tanto en el contenido total obtenido mediante suma de concentraciones como en el contenido de tirosol, hidroxitirosol y oleuropeína.

Aunque en la presente Tesis Doctoral, las diferencias de contenido de polifenoles entre las variedades Picual y Hojiblanca no son estadísticamente significativas, los resultados muestran una cantidad ligeramente superior en la variedad Picual, acorde con los resultados de otros autores. Resulta de gran interés que el contenido de polifenoles en el aceite de oliva de la variedad Picual sea elevado ya que esta variedad representa alrededor del 25% del total de la producción mundial de aceite.

Como ya se ha comentado, es importante destacar que la cantidad de polifenoles varía de forma considerable en función de la forma de expresar los resultados, siendo diferente la cantidad detectada si se expresa en equivalentes de tirosol, de la que se detecta si se expresa en equivalentes de ácido gálico o cafeico (Pirisi *et al.*, 1997), hecho que dificulta las comparaciones entre distintos autores.

Alguno de los factores que tienen gran influencia en el contenido de compuestos fenólicos en un aceite, son las **condiciones de cultivo** de la aceituna. Generalmente se acepta que la cantidad de compuestos fenólicos es más elevada en aquellos aceites obtenidos de cultivos sometidos a condiciones de estrés hídrico que en aquéllos que han sido más irrigados (Motilva *et al.*, 2000). Resultados contrarios son los que presentaron Dabbou *et al.* (2010) que analizaron mediante HPLC el contenido de polifenoles en el aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina cultivada bajo tres niveles de irrigación diferentes, y detectaron que la cantidad de los compuestos fenólicos aumentaba de forma directamente proporcional con la cantidad de agua utilizada en el cultivo, mostrando valores entre 193,25 mg/kg de aceite en el aceite menos irrigado a 271,72 mg/kg de aceite en el que la irrigación había sido mayor. En el estudio de Tovar *et al.* (2001), sin embargo, la cantidad de hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico y ácidos cumáricos no se vio afectada por la irrigación, mientras que los derivados secoiridoides aumentaron cuando los cultivos habían sido menos irrigados.

En cuanto a la relación de la cantidad de polifenoles con el **tiempo de almacenamiento** de los aceites, las referencias bibliográficas indican que el descenso de la cantidad de compuestos fenólicos a lo largo del tiempo de almacenamiento en el aceite de oliva se debe a los procesos de descomposición y a la actividad oxidativa de estos compuestos. Morelló *et al.* (2004) estimaron la cantidad total de polifenoles en aceites de la variedad Arbequina DOP Les Garrigues con el reactivo de Folin-Ciocalteu a 725 nm, expresaron los resultados en mg ácido cafeico /kg de aceite y cuantificaron los compuestos fenólicos mediante HPLC a 278 nm. Entre los distintos polifenoles cuantificados, todos mostraron un claro descenso al final del tiempo de almacenamiento (12 meses) a excepción del tirosol e hidroxitirosol cuya concentración se vio incrementada. Esta diferencia se explica porque durante el almacenamiento del aceite se produce la hidrólisis de secoiridoides como 3,4-DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA, los cuales contienen hidroxitirosol (3,4-DHPEA) y tirosol (p-HPEA) en su estructura molecular. De esta forma, la concentración de alcoholes fenólicos como tirosol e hidroxitirosol generalmente es más baja en aceites jóvenes pero se incrementa a lo largo del tiempo de almacenamiento

(Servili *et al.*, 2009). Méndez y Falqué (2007) compararon el efecto del tiempo de almacenamiento y del material del **envase** en diferentes AOVE (tabla 4.18).

**Tabla 4.18. Contenido en compuestos fenólicos (mg/kg) de cuatro tipos de aceites con distintos grados de acidez en función del tiempo de almacenamiento.**

Envase	Tiempo de almacenamiento (meses)	Aceite 1	Aceite 2	Aceite 3	Aceite 4
<b>Plástico</b>	0	285	519	549	433
	3	160	360	451	303
	6	39	120	139	108
<b>Plástico opaco</b>	3	164	387	466	305
	6	49	176	210	113
<b>Vidrio</b>	3	172	429	475	310
	6	66	194	217	165

Aceites 1 y 2 máximo de acidez 0,7°, aceites 3 y 4 máximo de acidez 0,5°

Lo más destacado de los valores obtenidos en este estudio es que el contenido de polifenoles en todos los aceites está influido en gran medida, como ya habíamos mencionado previamente, por el tiempo de almacenamiento. Se observa que estos aceites presentan un claro descenso de la cantidad de compuestos fenólicos a lo largo del tiempo (Del Caro *et al.*, 2006; Méndez y Falqué, 2007). En cuanto al envase utilizado, se pueden detectar cantidades mayores de polifenoles en los aceites envasados en vidrio que en plástico o plástico opaco, y ligeramente superior en los aceites contenidos en envase de plástico opaco que en plástico no opaco. También se observa que el aceite 1, con un contenido de polifenoles notablemente inferior al resto, posee una acidez más elevada que los aceites 3 y 4. Sin embargo, en el estudio no relaciona este menor contenido de compuestos fenólicos con la acidez, sino que lo asocia a las posibles

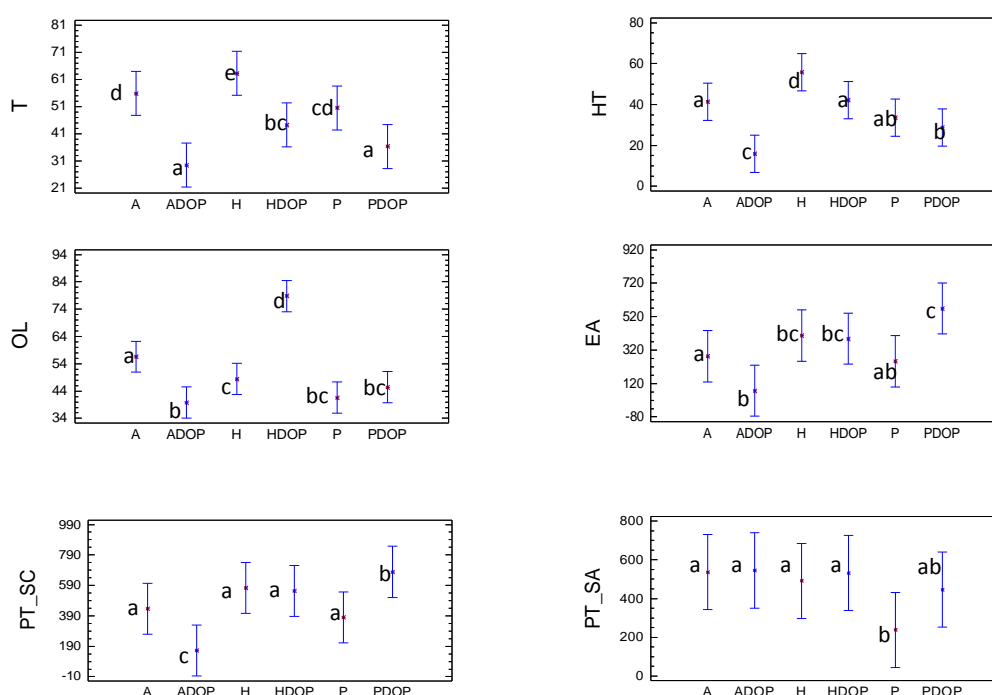
variaciones agronómicas de variedad, sistema de cultivo, factores ambientales o al sistema de extracción utilizado, factores que no se concretan en el estudio.

En el presente estudio no se ha realizado la evolución del contenido de polifenoles a lo largo del tiempo, aunque se podría pensar que si un AOVE ha presentado mucha menor cantidad que los demás, como en el caso del AOVE DOP variedad Arbequina, podría deberse a una mayor degradación de estos compuestos debido al tipo de envase. Sin embargo, este aceite estaba envasado en botella de vidrio verde, envase que impide en mayor grado el paso de la luz y el oxígeno que las botellas de plástico transparente, mientras que el aceite de la variedad Picual DOP, que ha presentado mayor cantidad, se encontraba almacenado en botella de plástico transparente. Así, es necesario indicar que probablemente el contenido reducido de polifenoles en Arbequina o el elevado contenido en Picual, se deba en mayor medida a la variedad de aceituna que al tipo de envase, como ya se ha discutido previamente.

Como se ha ido explicando a lo largo de esta Tesis Doctoral, los compuestos del aceite de oliva se degradan cuando se somete el aceite a altas temperaturas, almacenamiento prolongado, exposición a la luz, etc., sin embargo, este aceite muestra mayor **estabilidad a la oxidación** que otros aceites vegetales, debido por una parte al elevado contenido en ácido oleico y a la baja cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, ya que la degradación térmica aumenta con el número de insaturaciones; y por otra parte al contenido de polifenoles con capacidad antioxidante. Entre las variedades españolas, Cornicabra y Picual son las que presentan mayor contenido de ácido oleico y compuestos fenólicos (Aparicio *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 2001). El aceite de la variedad Arbequina contiene un 66% de ácido oleico y un 12% de linoleico, y Picual 80% de ácido oleico y un 4% de linoleico. Así, el estudio realizado por Gómez-Alonso *et al.* (2003) muestra que el hidroxitirosol y sus derivados desaparecieron más rápidamente durante calentamiento a 180° C en un aceite de la variedad Arbequina que en un aceite de la variedad Picual, con más cantidad de ácido oleico. Los resultados de Brenes *et al.* (2002) mostraron que el calentamiento de los aceites de la variedad Picual condujo a una menor pérdida de polifenoles comparado con la que se observó en los aceites de la variedad Arbequina,

efecto que podría estar relacionado con la menor cantidad de polifenoles presente en los aceites de esta variedad y con la diferente composición de los ácidos grasos de los dos aceites. De hecho, la estabilidad oxidativa de Picual fue superior que en Arbequina.

En lo referente al análisis estadístico, al aplicar el análisis de la varianza, se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ) (figura 4.30). Al analizar los distintos polifenoles de manera individual se aprecia la misma tendencia en las agrupaciones de medias entre las muestras, y se observa que el AOVE DOP de la variedad Arbequina presenta claras diferencias con respecto a los demás aceites, mostrando cantidades más bajas de los compuestos analizados, excepto en el caso de la cantidad de polifenoles calculada mediante suma de áreas donde el AOVE variedad Picual presenta los valores más bajos.



**Figura 4.30. Gráficas de medias del contenido de polifenoles por HPLC.** Test de ANOVA univariante y test de Tukey. (Letras diferentes significan variaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ). (T: tirosol, HT: hidroxitirosol, OL: oleuropeína, EA: ácido elenólico, PT\_SC: polifenoles totales por suma de concentraciones, PT\_SA: polifenoles totales por suma de áreas, A: Arbequina, ADOP: Arbequina DOP, H: Hojiblanca, HDOP: Hojiblanca DOP, P: Picual, PDOP: Picual DOP).

### 4.5.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Se ha realizado el estudio de componentes principales (PCA) de todas las muestras considerando todos los parámetros analizados: grado e índice de acidez (GA, IA), índice de peróxidos (IP), los índices K (K232, K268, K264, K272), diacilglicéridos (DAGs), polifenoles totales por espectrofotometría (TPF UV), tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína, ácido elenólico (T, HT, OL, AE), polifenoles totales analizados por HPLC mediante suma de concentraciones y suma de áreas (TPF SC y TPF SA).

La aplicación de un análisis de componentes principales clásico permite reducir la estructura multidimensional de los datos a un mapa tridimensional que explica el 86,987% del total de la varianza (47,462% del primer componente, 21,061% del segundo, 18,464% del tercero). De esta manera, para interpretar la variabilidad de los datos se consideran los tres primeros componentes principales como se muestra en la tabla 4.19.

**Tabla 4.19. Porcentaje de la variación total explicada por cada componente principal.**

Número	Autovalor	Porcentaje de la varianza (%)	Porcentaje acumulado (%)
<b>1</b>	7,11932	47,462	47,462
<b>2</b>	3,15921	21,061	68,524
<b>3</b>	2,76953	18,464	86,987
<b>4</b>	1,61296	10,753	97,740
<b>5</b>	0,338981	2,260	100,000
<b>6</b>	4,77575E-16	0,000	100,000

En la siguiente tabla 4.20 se muestra la participación de cada variable analizada en los tres componentes principales seleccionados, indicándose en negrita los valores más significativos. Por otra parte, en la tabla 4.21 se indica la participación de cada componente principal en las distintas variedades estudiadas.



**Tabla 4.20. Participación de cada parámetro estudiado en los componentes principales.**

Parámetros	Componentes		
	1	2	3
<b>GA</b>	0.25758	<b>-0.34568</b>	0.01152
<b>IA</b>	0.26035	<b>-0.36201</b>	0.06383
<b>IP</b>	0.26355	<b>-0.31451</b>	0.02092
<b>K232</b>	0.22111	0.23237	<b>-0.39517</b>
<b>K268</b>	<b>0.31848</b>	0.14949	-0.26769
<b>K264</b>	<b>0.31212</b>	0.20033	-0.21637
<b>K272</b>	<b>0.31421</b>	0.12814	-0.29732
<b>DAGs</b>	<b>-0.3397</b>	0.21446	-0.08842
<b>TPF UV</b>	0.27172	<b>0.32141</b>	0.17859
<b>T</b>	<b>0.30107</b>	-0.23154	0.23967
<b>HT</b>	0.27164	-0.04993	<b>0.35711</b>
<b>OL</b>	0.11835	<b>0.30745</b>	0.10112
<b>AE</b>	0.12789	0.34191	<b>0.37079</b>
<b>TPF SC</b>	0.16734	0.31749	<b>0.39019</b>
<b>TPF SA</b>	-0.19478	0.00028	<b>0.32812</b>

GA: grado de acidez, IA: índice de acidez, IP: índice de peróxidos, DAGs: diacilglicéridos, TPF UV: polifenoles totales determinados mediante espectrofotometría, T: tirosol, HT: hidroxitirosol, OL: oleuropeína, AE: ácido elenólico, TPF SC: polifenoles totales cuantificados mediante suma de concentraciones de los polifenoles individuales determinados mediante HPLC, TPF SA: polifenoles totales cuantificados mediante suma de las áreas de los polifenoles individuales determinados mediante HPLC.

**Tabla 4.21. Participación de los componentes principales en cada muestra de AOVE estudiada.**

Código de identificación	Componentes		
	1	2	3
A	1,34167	<b>- 1,50242</b>	0,47208
ADOP	<b>-4,75620</b>	-1,11872	-1,09848
H	1,09109	-1,38577	<b>2,28318</b>
HDOP	0,80109	<b>2,49894</b>	-0,21893
P	<b>2,78405</b>	-0,46774	-2,46873
PDOP	-1,26171	<b>1,97571</b>	1,03088

El primer componente principal está caracterizado (altamente correlacionado) positivamente por los parámetros K268, K264, K272 y tirosol, y negativamente por DAGs (tabla 4.20). Los AOVE más relacionados con el primer componente son los de la variedad comercial Picual, positivamente, y los de la variedad Arbequina DOP, negativamente (tabla 4.21). En los resultados obtenidos al analizar el AOVE de la variedad comercial Picual observamos que presenta valores elevados de los índices K268, 264 y 272, mientras que el AOVE de la variedad Arbequina DOP, ha presentado los valores más bajos de estos índices K. Además, el contenido de tirosol es elevado en el AOVE de la variedad Picual y muy bajo en Arbequina DOP, al contrario que en el caso de los DAGs donde Picual presenta valores bajos y Arbequina DOP el valor más elevado, lo que coincide con los resultados de este análisis de componentes principales que caracterizan negativamente el primer componente con los DAGs.

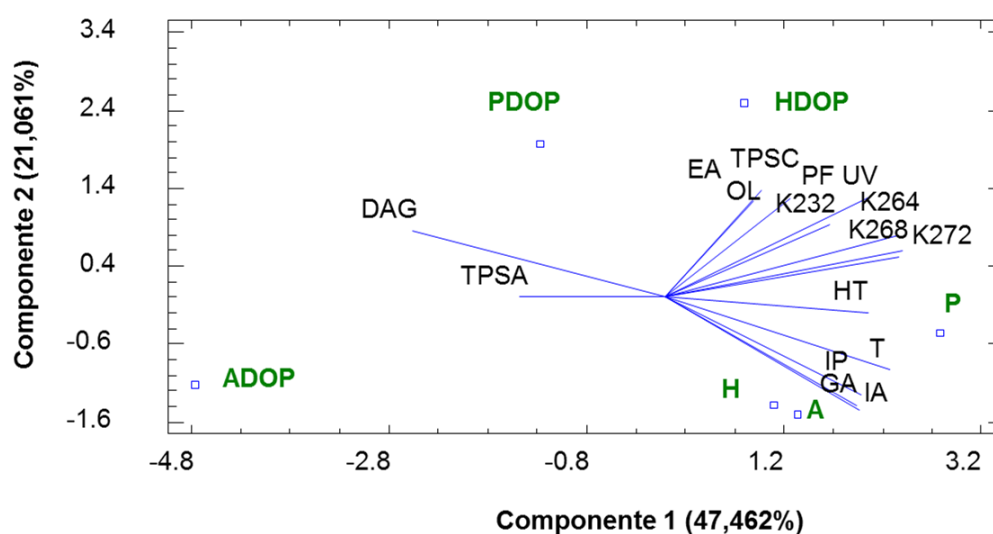
El segundo componente está caracterizado positivamente por los parámetros TPF UV (polifenoles totales analizados por espectrofotometría) y oleuropeína, y negativamente por el grado de acidez, el índice de acidez y el índice de peróxidos. En este caso, los aceites más relacionados con el segundo componente son Hojiblanca DOP, Picual DOP, ambos positivamente, y Arbequina negativamente. De acuerdo con los resultados

obtenidos en las determinaciones, los aceites de las variedades Hojiblanca DOP y Picual DOP han presentado mayor contenido de polifenoles totales analizados por espectrofotometría, Hojiblanca DOP mayor contenido de oleuropeína y menor grado/índice de acidez e índice de peróxidos, y Picual DOP menor grado e índice de acidez. De esta manera los resultados obtenidos concuerdan con el análisis de PCA. En el caso del AOVE de la variedad Arbequina, ocurre lo contrario (excepto en la variable oleuropeína) ya que este AOVE se relaciona negativamente con estos parámetros del segundo componente, presentando mayor valor del grado de acidez, índice de acidez, e índice de peróxidos que Hojiblanca DOP y Picual DOP, y menor cantidad de TPF UV.

El tercer componente queda definido positivamente por los parámetros hidroxitirosol, ácido elenólico, el TPF SC y TPF SA y negativamente por el índice K232. El AOVE Hojiblanca es el aceite que más se relaciona (positivamente) con este tercer componente, hecho que queda reflejado en que presenta un contenido elevado de hidroxitirosol, ácido elenólico y polifenoles totales analizados por HPLC, cuantificados mediante la suma tanto de las concentraciones de los compuestos fenólicos individuales como de sus áreas; y uno de los valores más bajos del índice K232.

Los dos primeros componentes, que son los que más influyen en la variación de los resultados analizados, se representan en la figura 4.31 donde gráficamente se puede observar que los aceites DOP quedan separados de los no DOP. Este análisis estadístico sitúa a los AOVE de calidad comercial (sin DOP) agrupados en el tercer cuadrante mientras que cada una de las DOP se sitúa en los otros tres cuadrantes restantes indicando una distinción entre ellos.

Este análisis de componentes principales es, por tanto, un resumen que explica los resultados obtenidos y pone de manifiesto que los aceites de oliva virgen extra de calidad diferenciada, DOP, tienen unas características únicas que los diferencia de los demás, mientras que en los aceites que carecen de esta denominación las diferencias no son tan acusadas.



**Figura 4.31. Análisis de Componentes Principales de los parámetros analizados en los AOVE estudiados.**

#### 4.5.4. ESTUDIO DE LAS ALEGACIONES DE SALUD EN EL ACEITE DE OLIVA Y LOS POLIFENOLES

En relación al aceite de oliva, y considerando el Reglamento de alegaciones nutricionales 1924/2006, existen dos aspectos a considerar en sus posibles alegaciones, el beneficio de su fracción grasa constituida por ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y el de sus componentes minoritarios, en especial los polifenoles. Se han presentado un total de 18 declaraciones todas correspondientes al artículo 13(1) alegaciones generales o de función, de las cuales el Reglamento 432/2012 reconoce hasta tres alegaciones que se podrán utilizar en la comunicación comercial del aceite de oliva, relativas a los polifenoles al ácido oleico y a los ácidos grasos monoinsaturados/poliinsaturados (MUFA/PUFA). Las alegaciones autorizadas pueden ser utilizadas por las empresas que comercializan aceite de oliva siempre que cumplan los requisitos del dictamen científico de la declaración correspondiente y con el Reglamento 1924/2006.

Relativa al ácido oleico:

**“La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”**. El ácido oleico es un ácido graso insaturado (EFSA, 2011c).

Relativa a los ácidos grasos monoinsaturados y/poliinsaturados:

**“La sustitución de las grasas saturadas por insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol en sangre”** (EFSA, 2011d).

Relativa a polifenoles:

**“los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al estrés oxidativo”** (EFSA, 2011b).

Se ha evaluado y autorizado, con resultados satisfactorios la alegación relacionada con la sustitución de los ácidos grasos saturados por *cis*-MUFAs (ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico) y/o *cis*-PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) en la dieta y el mantenimiento de los niveles normales del colesterol-LDL en sangre. Los ácidos grasos saturados producen un aumento de las concentraciones en sangre del colesterol total y el colesterol LDL en relación con los ácidos grasos monoinsaturados (*cis*) (Lichtenstein *et al.*, 2006; Mensink *et al.*, 2003) y existe una relación lineal dosis-respuesta entre la concentración de colesterol-LDL y la ingesta de ácidos grasos saturados de cadena larga.

Respecto a las declaraciones de salud del ácido oleico, ácido graso monoinsaturado y mayoritario en el aceite de oliva, la alegación autorizada es la siguiente: “La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo” (EFSA, 2011c; Reglamento 432/2012). Esta declaración sólo puede utilizarse respecto a alimentos con alto contenido de ácidos grasos insaturados, de acuerdo con la declaración “alto contenido de grasas insaturadas” que figura en el anexo del Reglamento 116/2010: “Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas insaturadas, si al menos un 70% de los ácidos

grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20% del valor energético del producto”.

La declaración autorizada referente a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y/poliinsaturados (PUFAs) es “La sustitución de las grasas saturadas por insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol en sangre” (EFSA 2011d; Reglamento 432/2012). Los MUFAs y PUFAs son grasas insaturadas. Al igual que en el caso anterior, esta declaración sólo puede utilizarse referida a alimentos con alto contenido de ácidos grasos insaturados, de acuerdo con la declaración “alto contenido de grasas insaturadas” recogida en el Reglamento 1924/2006 y Reglamento 116/2010. El aceite de oliva, aunque mayoritariamente contiene ácido oleico, posee también otros ácidos grasos insaturados como el ácido linolénico y el ácido linoleico, ambos ácidos grasos poliinsaturados.

Por otro lado, en cuanto a las alegaciones relativas a los polifenoles del aceite de oliva, al no tratarse de nutrientes, estarían incluidos en la categoría de “otras sustancias”. Los efectos alegados relativos a estos compuestos fenólicos han sido “reduce el estrés oxidativo”, “propiedades antioxidantes”, “metabolismo lipídico”, “actividad antioxidante, protegen las células del cuerpo y las LDL del daño oxidativo”, y “propiedades antioxidantes”. La población diana se asume que son individuos sanos.

Hasta la fecha, como ya se ha visto, existe una única alegación autorizada por el Panel relativa a polifenoles del aceite de oliva: “los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al estrés oxidativo” (EFSA, 2011b; Reglamento 432/2012).

Para garantizar la veracidad de la declaración, es necesario que los compuestos fenólicos estén presentes en el aceite de oliva en cantidades que sean suficientes para producir el efecto fisiológico declarado, además de que deben ser asimilables por el organismo. De esta manera, a partir de los estudios realizados, se ha establecido que esta alegación sólo puede ser utilizada en aceites de oliva que contengan al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (como el complejo oleuropeína y tirosol) por 20 g de aceite de oliva.

Teniendo en cuenta que una de las finalidades del Reglamento 1924/2006 es garantizar que las declaraciones de propiedades saludables sean veraces, claras, fiables y útiles para el consumidor, éste ha de ser informado apropiadamente de que este efecto beneficioso se obtiene con un consumo diario de 20 g de aceite de oliva, lo que garantizaría, para la mayoría de aceites de oliva, el aporte de los 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados. Esta cantidad correspondiente a 20 g de aceite de oliva se puede alcanzar fácilmente si se consumen cantidades moderadas de aceite de oliva en el contexto de una dieta equilibrada; sin embargo, para aquellos aceites de oliva que contengan una cantidad baja de polifenoles habría que aumentar el consumo de aceite de oliva para poder conseguir las cantidades recomendadas.

Ésta ha sido la única declaración relacionada con polifenoles y aceite de oliva aprobada por la EFSA de un total de siete declaraciones presentadas. Las otras seis están relacionadas con el mantenimiento de niveles normales en sangre de colesterol HDL, el mantenimiento de la presión arterial normal, propiedades antiinflamatorias, la salud del tracto respiratorio superior, el mantenimiento de la función normal del tracto gastrointestinal y la defensa del cuerpo frente a agentes externos. Estas alegaciones han sido desestimadas por varias razones como la falta de estudios en humanos, porque los resultados obtenidos fueron insuficientes para demostrar el efecto, debido a que la alegación no estaba suficientemente definida, y en el caso de la alegación relacionada con las propiedades antiinflamatorias, el efecto declarado estaba referido a enfermedades como osteoartritis o artritis reumatoide, en donde una reducción de la inflamación estaría relacionada con el tratamiento de la enfermedad, con lo que no cumpliría con los criterios del Reglamento 1924/2006.

Los estudios científicos aportados y que han sido clave para la aceptación de la alegación referida a los polifenoles del aceite de oliva y la protección de los lípidos de la sangre frente al estrés oxidativo, son los siguientes.

En un estudio de intervención multicéntrico controlado, aleatorizado y cruzado en humanos, 200 varones consumieron durante tres semanas 25 ml/día de tres tipos de aceite de oliva que contenían cantidades elevadas, moderadas o bajas de hidroxitirosol,

tirosol y derivados de oleuropeína, (Covas *et al.*, 2006b). Se midieron en plasma las LDL oxidadas, la cantidad total en plasma de F2alfa-isoprostanos, de ácidos grasos hidroxí de 18 carbonos y la fracción de colesterol LDL. Se midió también la excreción en orina del hidroxitirosol y tirosol. Al finalizar el estudio se observó un descenso de los biomarcadores de la peroxidación lipídica (los dienos conjugados, los hidroxí-ácidos grasos y las LDL oxidadas) inversamente proporcional al incremento del consumo de los polifenoles contenidos en el aceite de oliva.

El Panel ha considerado que el tamaño de la muestra de este estudio es amplia, que los polifenoles en los aceites de oliva utilizados están suficientemente bien caracterizados, que se han utilizado biomarcadores de la peroxidación lipídica válidos, en particular de la peroxidación de las LDL, y que la relación dosis-respuesta observada entre el consumo de polifenoles del aceite de oliva y la disminución en la peroxidación de las LDL está justificada.

En otro estudio se investigó el efecto específico de los metabolitos fenólicos en la composición y peroxidación de los lípidos LDL (de la Torre-Carbot *et al.*, 2010) en una submuestra del estudio de Covas *et al.* (2006b) que consistió en 36 varones de los seis centros que participaban en el ensayo y que consumieron los tres tipos de aceite de oliva con contenido elevado, medio y bajo de polifenoles. Se produjo un incremento de las concentraciones de monosulfato de hidroxitirosol y sulfato de ácido homovanílico (pero no de sulfato de tirosol) en las partículas LDL, mientras que la concentración de los marcadores de la peroxidación lipídica, incluyendo LDL (LDL oxidadas, dienos conjugados e hidroxí-ácidos grasos) disminuyó significativamente después de la ingesta de aceite de oliva que contenía una cantidad elevada de polifenoles.

En una intervención clínica controlada, cruzada, aleatorizada y doble ciego en 30 voluntarios varones sanos, se utilizaron aceites de oliva (refinado, común y virgen, 25 ml/día) con concentraciones crecientes de polifenoles durante tres semanas (Marrugat *et al.*, 2004). En este caso se observó también un descenso de la peroxidación lipídica relacionada con el consumo de polifenoles.



En el estudio realizado por Weinbrenner *et al.* (2004) (estudio cruzado, doble ciego y aleatorizado) se utilizó una muestra de 12 varones sanos que consumieron aceite de oliva en cantidades bajas, moderadas y elevadas de fenoles durante 4 días, observándose los mismos resultados que en los estudios anteriores, además de producirse un incremento de la actividad glutatión peroxidasa.

Asimismo, se estudió la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y se observó que la absorción de los polifenoles en aceite de oliva es probablemente mayor del 55-66 mol%, que la absorción del hidroxitirosol es dosis-dependiente, que el tirosol e hidroxitirosol se incorporan a las fracciones lipoproteicas, y que el hidroxitirosol es excretado en orina como conjugado glucurónido (Bonanome *et al.*, 2000; Edgecombe *et al.*, 2000; Visioli *et al.*, 2001; Vissers *et al.*, 2002; Miro-Casas *et al.*, 2003; de la Torre-Carbot *et al.*, 2010). La incorporación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a las LDL se ha propuesto como mecanismo por el cual estos compuestos pueden proteger las LDL de la peroxidación.

Con todos los estudios aportados, el Panel concluye que se ha establecido una relación causa efecto y dosis dependiente entre el consumo de los polifenoles del aceite de oliva (estandarizados por su contenido en hidroxitirosol y sus derivados) y la protección de las LDL del daño oxidativo. Es destacable señalar que sólo se han presentado estudios en donde los polifenoles estaban presentes en el aceite de oliva, y que no existen datos disponibles para otras matrices.

Según la alegación autorizada sobre aceite de oliva y polifenoles, el efecto beneficioso se consigue ingiriendo 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados como el complejo oleuropeína (no especificando cuáles) y tirosol que, de acuerdo con la EFSA, se consigue con un consumo de 20 g de aceite de oliva en la mayoría de los aceites. En la presente Tesis Doctoral se ha calculado qué cantidad de estos tres compuestos se aportaría con un consumo de 20 g de los aceites de oliva virgen extra analizados y cuánto aceite habría que consumir diariamente para conseguir el efecto saludable según la EFSA (tabla 4.22).

**Tabla 4.22. Contenido en tirosol, hidroxitirosol y oleuropeína de los distintos AOVE analizados (mg/kg de aceite).**

Código del producto	Tirosol	Hidroxitirosol	Oleuropeína	Total (1)	(2)	(3)
Arbequina	55,892	41,252	56,584	153,728	<b>3,075</b>	33
Arbequina DOP	29,45	16,013	39,786	85,249	<b>1,705</b>	59
Hojiblanca	63,23	55,847	48,383	167,46	<b>3,349</b>	30
Hojiblanca DOP	44,244	42,217	78,788	165,249	<b>3,305</b>	30
Picual	50,504	33,527	41,585	125,616	<b>2,512</b>	40
Picual DOP	36,365	28,739	45,359	110,463	<b>2,209</b>	45

(1) calculado como la suma de los tres compuestos (mg/kg aceite).

(2) cantidad del total de polifenoles (mg) presente en 20 g de aceite.

(3) cantidad de aceite en gramos que aporta 5 g del total de polifenoles.

Se puede apreciar que ninguno de los seis aceites de oliva virgen extra del estudio contiene en 20 g de aceite la cantidad de polifenoles requerida por la EFSA para poder sustentar la alegación (expresados como suma de oleuropeína (3,4-DHPEA-EA), tirosol (p-DHPEA) e hidroxitirosol (3,4-DHPEA)). Los valores más altos se observan en los dos aceites de la variedad Hojiblanca, cuyo consumo para alcanzar los 5 mg de compuestos fenólicos debería ser de 30 g. Los resultados indicados en la bibliografía y discutidos previamente muestran también cantidades de estos tres compuestos similares a los del presente estudio, no alcanzando los 5 mg de polifenoles por 20 g de aceite (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2007; Gómez Rico *et al.*, 2008; Lozano-Sánchez *et al.*, 2010). Sin embargo, si se incluyen también en el total otros compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva, sí se conseguirían los 5 mg de polifenoles/20 g de aceite ya que se corresponde con 250 mg

de polifenoles totales/kg de aceite, cantidad superada en la mayoría de los estudios de los autores mencionados y en el presente trabajo.

Es necesario tener en cuenta que la alegación puede ser aplicada a cualquier aceite de oliva que cumpla las especificaciones no siendo necesario que se trate de un aceite de oliva virgen. Los aceites de oliva objeto del estudio tienen la categoría de virgen extra, es decir, son aceites de elevada calidad y como ya se ha descrito, a priori poseen mayor contenido de compuestos fenólicos que los aceites de oliva sin la mención de virgen extra. A un aceite de oliva virgen no se le puede adicionar ningún compuesto ya que tiene que obtenerse únicamente del zumo de la aceituna por procedimientos mecánicos. Sin embargo, esto no es así en el caso de aceites de oliva no vírgenes, donde sí se podría adicionar compuestos fenólicos. Esto quiere decir que mientras 20 g de un aceite de oliva virgen puede que no alcance un contenido de polifenoles de 5 mg, sí se podría lograr en un aceite de oliva al que se le añadan externamente, y en consecuencia, podría sustentar la alegación de propiedades saludables.

## 4.6. CONCLUSIONES PARCIALES

1. Todas las muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral cumplen los requisitos exigidos por el Reglamento 2568/91 en cuanto al parámetro de grado/índice de acidez, índice de peróxidos y la mayoría de los índices K.

**Grado de acidez:** la muestra analizada que ha presentado menor grado de acidez ha sido el AOVE DOP de la variedad Picual y la de mayor valor el aceite sin denominación de origen de la variedad Arbequina. Todos los aceites DOP han presentado menor acidez que los aceites sin DOP.

**Índice de peróxidos:** el AOVE DOP de la variedad Hojiblanca ha mostrado el valor más bajo, mientras que el aceite con mayor índice de peróxidos ha sido el de la variedad Picual sin DOP. Los aceites DOP han presentado menor índice de peróxidos que los que no tienen esta certificación.

**Índices K:** Todos los aceites de oliva analizados muestran un valor de K232 dentro de los requerimientos para poder ser considerados AOVE. El aceite DOP de la variedad Arbequina es el que ha presentado el valor más bajo, y el aceite DOP Hojiblanca el valor de índice K232 más elevado, aunque muy similar al de Picual sin DOP. Si bien el índice K268 ha sido en ocasiones superior al establecido por la legislación (aceites de las variedades Arbequina, Picual, Hojiblanca DOP y Picual DOP), la determinación de  $\Delta K$ , que tiene en cuenta todos los índices K y da una idea global de la calidad del aceite, se ha encontrado dentro de los límites aceptados.

2. En cuanto a otros índices de calidad no exigibles por la reglamentación europea (diacilglicéridos y polifenoles):

Todas las muestras analizadas cumplen los requisitos exigidos por la legislación alemana en cuanto al parámetro de **diacilglicéridos**. Los aceites DOP han presentado una mayor proporción de 1,2-diacilglicéridos con respecto al total, superior al de los aceites sin denominación de origen, lo que indica mayor calidad del aceite. Los aceites elaborados a partir de la variedad Arbequina (tanto DOP como sin DOP) muestran un

porcentaje superior. Por el contrario, el AOVE de variedad Hojiblanca ha mostrado una relación inferior. El AOVE que más cantidad de **polifenoles** totales ha mostrado al analizar los aceites tanto por espectrofotometría como por HPLC (cuantificados mediante la suma de las concentraciones de tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína y ácido elenólico) ha sido el AOVE DOP de la variedad Picual, y el que menos el AOVE DOP variedad Arbequina, que además ha presentado las cantidades más bajas de tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína y ácido elenólico. Hojiblanca ha sido la variedad de aceite con mayor contenido de tirosol e hidroxitirosol; el AOVE DOP variedad Hojiblanca ha mostrado mayor concentración de oleuropeína, y el AOVE DOP Picual el aceite con mayor contenido de ácido elenólico.

3. En cuanto a las **alegaciones** permitidas referidas al aceite de oliva, la EFSA ha autorizado las relacionadas con los polifenoles del aceite de oliva y las referidas a las grasas insaturadas:
  1. “La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”. En este grupo de ácidos grasos insaturados están incluidos los ácidos grasos monoinsaturados (como el ácido oleico) y poliinsaturados.
  2. “Los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al estrés oxidativo”.



## 5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---



## CONCLUSIONES

### ESTUDIO DEL CONTENIDO DE LICOPENO EN LOS DERIVADOS DE TOMATE

1. El **contenido inicial** de licopeno de las muestras analizadas en este trabajo es muy diferente en cada tipo de derivado de tomate, los niveles más bajos de este compuesto se observan en el gazpacho (5 mg/100 g) mientras que los valores más elevados corresponden a los ketchup, destacando K-H (24,60 mg/100 g).
2. En cuanto a la **influencia del almacenamiento** sobre el contenido de licopeno a lo largo de la vida útil de los distintos productos analizados, este compuesto se mantiene estable a lo largo del tiempo de vida útil del gazpacho mostrando unas pérdidas finales de 5,64%, mientras que el resto de productos presentan unas pérdidas del contenido inicial de licopeno superior al 40%. Se observa una notable disminución del contenido en licopeno a partir de los 6 meses de almacenamiento, destacando las elevadas pérdidas en el ketchup K-C (93%). Por tanto, es importante destacar el efecto negativo que ejerce el tiempo de almacenamiento sobre la composición de los derivados de tomate, resultando fundamental la adecuada conservación de estos productos y el acortamiento del tiempo que éstos permanecen almacenados antes de su consumo, para garantizar la existencia de cantidades suficientes de licopeno y asegurar un efecto fisiológico beneficioso.
3. Considerando las recomendaciones planteadas por Rao (2006) de 7-8 mg de licopeno/día para poder ejercer un efecto antioxidante beneficioso para la salud, este requerimiento quedaría cubierto con la ingesta de:
  - Una ración de **gazpacho** de 250 ml.
  - Una ración (250 ml) de cualquiera de las muestras de **zumos** considerados.
  - En el caso de los **ketchups** K-H y K-P, sería necesaria la ingesta de 3 raciones (10 ml) si se trata de una muestra recién comercializada, y de 7 raciones en el final de su vida útil. En el caso de la muestra K-C, los niveles de licopeno dejan



de ser significativos (inferiores a 5 mg/100 g) a partir del 5º mes de almacenamiento.

- 100 ml de cualquiera de las **salsas** consideradas.
  - 125-150 ml del tomate entero pelado y tomate triturado.
4. El **modelo matemático** no lineal Radial Basis Network (RBN) propuesto, ha demostrado ser un método útil y rápido para estimar los contenidos de licopeno en distintos derivados de tomate, mostrando un MPE menor de 3 y un  $R^2$  cercano a 1. Este modelo ofrece estimaciones más exactas en muestras homogéneas de derivados de tomate donde el tomate es el componente principal del producto, con lo que es especialmente recomendable en estos casos.
5. En cuanto a las declaraciones de propiedades en el etiquetado, únicamente están autorizadas las **declaraciones de contenido** en los productos que contienen licopeno. En relación con las **declaraciones de propiedades saludables**, sólo se ha autorizado una alegación relativa a los derivados de tomate correspondiente a un concentrado de tomate carente de licopeno cuyo efecto alegado es “reducción de la agregación plaquetaria”. Referente al licopeno, ninguno de los estudios revisados cumple completamente con los requisitos de la EFSA para la sustentación de las alegaciones de propiedades antioxidantes del licopeno.

#### ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

6. Todas las muestras analizadas de aceite de oliva virgen extra en la presente Tesis Doctoral cumplen los requisitos exigidos por el Reglamento 2568/91 en cuanto al parámetro de grado/índice de acidez, índice de peróxidos, el índice K232,  $\Delta K$  y la mayoría de los índices K268.
7. Los aceites de oliva denominación de origen han mostrado mejores resultados que los que no poseen esta certificación. En cuanto al grado de acidez, el AOVE DOP de

la variedad Picual ha presentado el menor grado de acidez entre todas las muestras, Hojiblanca DOP el menor índice de peróxidos, y el aceite DOP de la variedad Arbequina el que ha presentado el valor más bajo de los índices K232 y K268. Así, los aceites que poseen este sello de calidad han mostrado en este estudio una mejor calidad con respecto al resto de AOVE analizados.

8. Todas las muestras analizadas cumplen los requisitos exigidos por la legislación alemana en cuanto al parámetro de **diacilglicéridos**. Los aceites elaborados a partir de la variedad Arbequina (tanto DOP como sin DOP) muestran un porcentaje superior. Por el contrario, el AOVE de variedad Hojiblanca ha mostrado una relación inferior.
9. El AOVE con mayor cantidad de **polifenoles** totales analizados tanto por espectrofotometría como por HPLC (cuantificados mediante la suma de las concentraciones de tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína y ácido elenólico) ha sido Picual DOP, y el que menos, Arbequina DOP seguido de Arbequina. De esta manera, se observa que la variedad de aceituna tiene un papel fundamental en la cantidad total de polifenoles en el aceite, siendo elevada en la variedad Picual e inferior en Arbequina, mientras que Hojiblanca presenta valores intermedios.
10. En cuanto a las **alegaciones** de salud referidas al aceite de oliva, la EFSA ha autorizado las siguientes:
  - Referidas a las grasas insaturadas (ácidos grasos monoinsaturados (como el ácido oleico) y poliinsaturados): “La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”.
  - Relacionadas con los polifenoles del aceite de oliva “Los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al estrés oxidativo”.

Por todo ello, es necesario resaltar la importancia del consumo de estos dos productos característicos de la dieta mediterránea, tanto por su valor nutricional como por los efectos positivos mostrados sobre la salud humana en la prevención de diversas enfermedades, debido a su contenido significativo en compuestos bioactivos, entre otros, licopeno en los derivados de tomate y polifenoles en el aceite de oliva virgen extra.

## CONCLUSIONS

### LYCOPENE CONTENT ON TOMATO-BASED PRODUCTS

1. Initial lycopene content was very different in each type of tomato-based products analyzed in this work, the lowest levels were observed in the gazpacho (5 mg/100 g) while the highest were detected in ketchup, highlighting the sample K-H (24.60 mg/100 g).
2. It is important to note the negative effect of storage time on tomato-based products lycopene content. This compound was more stable during gazpacho shelf life showing final losses of 5.64 % of initial content, while other products presented a reduction exceeding 40%. A remarkable decrease on lycopene content was found in the samples after 6 months storage, highlighting the large decrease on ketchup K-C lycopene content (93%). Therefore, an appropriate conservation of these products is essential in order to ensure sufficient quantities of lycopene are present to have a beneficial physiological effect.
3. Considering the recommendations made by Rao (2006), 7-8 mg lycopene/day are necessary to show beneficial antioxidant health effects, this requirement would be covered with the intake of:
  - One serving of 250 ml gazpacho.
  - One serving (250 ml) from any considered juice.
  - In the case of ketchup K-P and K-H, 3 servings (10ml) would be necessary if it is recently produced, and 7 portions at the end of its shelf life. For the sample K-C, lycopene levels become insignificant (below 5 mg /100 g) after the 5th month of storage.
  - 100 ml of either considered sauces.
  - 125-150 ml of whole peeled tomatoes and crushed tomatoes.

4. Nonlinear mathematical model, Radial Basis Network (RBN), has proved to be a useful and easy tool to estimate the lycopene content in different tomato-based products, showing a MPE lower than 3 and a  $R^2$  close to 1. This model is particularly relevant for homogeneous samples of tomato-based products, where the tomato is the main component.
5. As for the health claims, according with Regulation 1924/2006, only one claim has been authorized referring to tomato-based products corresponding to a tomato concentrate devoid of lycopene, which claimed effect is "reduction of platelet aggregation."

#### EXTRA VIRGIN OLIVE OIL QUALITY

6. All extra virgin olive oil samples analyzed meet the requirements of Regulation 2568/91 concerning the parameters of free fatty acid, peroxide value, K232,  $\Delta K$  and most of K268 indexes.
7. Extra virgin olive oils with a denomination of origin analyzed yielded better results than those without this certification. Regarding the free fatty acid value, EVOO Picual DO had the lowest value among the samples, EVOO Hojiblanca DO the lowest peroxide value, and Arbequina DO had the lowest K232 and K268 indexes. Thus, the oils with this quality certification were determined to have better quality compared to those EVOO without analyzed in this study.
8. All samples analyzed meet the requirements of the German regulation regarding **diacylglycerides**. Oils made from Arbequina (both DO and without DO) had a higher percentage, while EVOO Hojiblanca had a lower ratio.
9. Picual DO was the EVOO containing the highest content of total **polyphenols**, analyzed by spectrophotometry and HPLC (quantified by the sum of the concentrations of tyrosol, HT, elenolic acid and oleuropein), and the lowest values were found in EVOO Arbequina DO followed by Arbequina. Thus, it appears that the variety of olives has a key role in the total amount of polyphenols in olive oil,

being high in the variety Picual and lower in Arbequina while Hojiblanca has intermediate values.

10. With regard to health claims relating to olive oil, EFSA has authorized the following:

- Related to olive oil polyphenols “Olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress”.
- Referred to unsaturated fats (monounsaturated fatty acids (as oleic acid) and polyunsaturated): "Replacing saturated fats in the diet with unsaturated fats contributes to the maintenance of normal blood cholesterol levels".

Considering all of these factors, we must emphasize the importance of these essential products to the Mediterranean diet, tomato products and olive oil, both for their nutritional value and significant content of bioactive compounds, such as lycopene in tomato- based products and polyphenols in extra virgin olive oil.





## 6. BIBLIOGRAFÍA

---





## 6.1. BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA

- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. y Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32 (1), 31-36.
- Agarwal, S. y Rao, A. V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Journal of Canadian Medical Association*. 163 (6), 739-744.
- Agudo, A. y González, C. A. (2007) Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1634-42.
- Ahuja, K. D., Pittaway, J. K. y Ball, M. J. (2006). Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation. *Nutrition*, 22 (3), 259-265.
- Alonso-Aperte, E. (2011). Patrones de dieta actual en el mundo mediterráneo. En *¿Es posible la Dieta Mediterránea en el siglo XXI?* Alonso-Aperte, E., Varela Moreiras, G., Silvestre-Castelló, D. *International Marketing Communication*, 3, 39-54.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. y Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25 (9), 2097-2116.
- Angelova, T. y Warthesen, J. (2000). Lycopene stability in tomato powders. *Journal of Food Science*, 65 (1), 67-70.
- AOCS (2009a). American Oil Chemists' Society. Free Fatty Acids. AOCS Official Method Ca 5a-40.
- AOCS (2009b). American Oil Chemists' Society. Peroxide Value Acetic Acid- Isooctane Method. AOCS Official Method Cd 8b-90.
- AOCS (2009c). American Oil Chemists' Society. Determination of Specific Extinction of Oils and Fats, Ultraviolet Absorption. AOCS Official Method Ch 5-91.
- Aparicio, R. y Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *The European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 614-627.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A. y Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (10), 4150-4155.
- Aranceta, J. y Serra-Majem, L. (2001). On behalf of the Working Party for the Development of Food-Based Dietary Guidelines for the Spanish Population. *Public Health Nutrition*, 4 (6A), 1403-1408.

- Arday, Z., Báñez Sánchez, F. y Alaminos García, P. (2004). Aceite de oliva: influencia y beneficios sobre algunas patologías. *Anales de Medicina Interna*, 21 (3), 138-142.
- Asemesa (2014). Asociación de Exportadores de Aceitunas de Mesa. Disponible en: <http://www.abc.es/agencias/noticia.asp?noticia=160638>. [Último acceso: 12/11/14].
- ASOLIVA (2014). Asociación Española de la Industria y el Comercio Exportador del Aceite de Oliva. Disponible en: [www.asoliva.es](http://www.asoliva.es). [Último acceso: 01/12/14].
- Aune, D., Chan, D. S., Vieira, A. R., Rosenblatt, D. A. N., Vieira, R., Greenwood, D. C. y Norat, T. (2012). Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 356-373.
- Babich, H. y Visioli, F. (2003). *In vitro* cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Il Farmaco*, 58 (5), 403-407.
- Babio, N., Bullo, M., Basora, J., Martínez-González, M. A., Fernández-Ballart, J., Márquez-Sandoval, F., Molina, C. y Salas-Salvadó, J. (2009). Adherence to the Mediterranean Diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19 (8), 563-570.
- Bach-Faig, A., Berry, E. M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., Medina, F.X., Battino, M., Belahsen, R. Miranda, G. y Serra-Majem, L. (2011). Mediterranean Diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, 14 (12A), 2274-2284.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G. y Montedoro, G. F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (11), 1589-1593.
- Basu, A. e Imrhan, V. (2007). Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*. 61 (3), 295-303.
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C-H., Smith, A. B. y Breslin, P. A. (2005). Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437 (7055), 45-46.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. y Lercker, G. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12 (8), 1679-1719.
- Berliner J. A. y Heinecke J. W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 707-727.
- Bernini, R., Merendino, N., Romani, A. y Velotti, F. (2013). Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Current Medicinal Chemistry*, 20 (5), 655-670.

- Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Hernández Blanco, I., Hoffmann, T., Martin, H., Mayer, B., Noack, P., Christoph, R., Schmdt, M., Schülke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H. Stahl, W. y Walsh, R. (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (6), 559-568.
- Bhuvaneswari, V. y Nagini, S. (2005). Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5 (6), 627-635.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. y Saija, A. (1999). On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 31, 971– 974.
- Boileau, T. W. M., Boileau, A. C., y Erdman, J. W. (2002). Bioavailability of all-trans and *cis*-isomers of lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227 (10), 914-919.
- Bolling, B. W., Ji, L. L., Lee, C. H. y Parkin, K. L. (2011). Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. *Food Chemistry*, 124, 1–6.
- Bonanome, A., Pagnan, A., Caruso, D., Toia, A., Xamin, A., Fedeli, E., Berra, B., Zamburlini, A., Ursini, F. y Galli, G. (2000). Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 10 (3), 111-120.
- Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G. y Gallina Toschi, T. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (23), 7026-7032.
- Bosetti, C., Pelucchi, C. y La Vecchia, C. (2009). Diet and cancer in Mediterranean countries: carbohydrates and fats. *Public Health Nutrition*, 12 (9A), 1595-1600.
- Boskou, D., Blekas, G. y Tsimidou, M. (2006b). Olive oil composition. En *Olive oil. Chemistry and technology*. 2nd ed. D. Boskou. AOCS Monograph Series on Oilseeds. AOCS Press, Champaign, Illinois, 41-72.
- Boskou, D., Tsimidou, M. y Blekas, G. (2006a). Polar Phenolic Compounds. En *Olive oil. Chemistry and technology*. 2nd ed. D. Boskou. AOCS Monograph Series on Oilseeds. AOCS Press, Champaign, Illinois, 73-92.
- Bravo, S. (2013). Optimización del contenido y disponibilidad del licopeno y otros compuestos bioactivos en tomate y productos elaborados con tomate. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España.
- Brenes, M., García, A., Dobarganes, M. C., Velasco, J. y Romero, C. (2002). Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 5962-5967.

- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J. y Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (9), 3535-3540.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9, 1551-1558.
- Buckland, G., Bach, A. y Serra-Majem, L. (2008). Obesity and the Mediterranean Diet: a systematic review of observational and intervention studies. *Obesity Reviews*, 9 (6), 582-593.
- Buckland, G., González, C. A., Agudo, A., Vilardell, M., Berenguer, A., Amiano, P., Ardanaz, E., Arriola, L., Barricarte, A., Basterretxea, M., Chirlaque, M.D., Cirera, L., Dorronsoro, M., Egües, N., Huerta, J.M., Larrañaga, N., Marin, P., Martínez, C., Molina, E., Navarro, C., Quirós, J.R., Rodríguez, L., Sánchez, M.J., Tormo, M.J. y Moreno-Iribas, C. (2009). Adherence to the Mediterranean Diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 170 (12), 1518-1529.
- Cámara, M. (2006a). Calidad Nutricional y Salud. En *Mejora genética de la calidad en plantas*. SECH. Sociedad Española de Genética. 45-65. Valencia, España.
- Cámara, M. y Sánchez-Mata, M. C. (2006b). Tomatoes, Lycopene and Human Health. En: *Lycopene Analysis in Foods*; Rao V., Ed.; Caledonian Press: Barcelona, Spain, 260 (7), 39-62.
- Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Fernández-Redondo, D., Sánchez-Mata, M. y Torrecilla, J. S. (2012a). Radial Basis Network analysis to estimate lycopene degradation kinetics in tomato-based products. *Food Research International*, 49 (1), 453-458.
- Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Fernández-Redondo, D., Sánchez-Mata, M., Cámara, R. M. y Gervás, C. (2012b). EFSA scientific requirements related to lycopene as antioxidant prevention of oxidative damage and cardiovascular health claims. *Acta Horticulturae*, International Society for Horticultural Sciences. Cámara, M., Battilani, A. y Colvine, S. (Eds.) Leuven (Bélgica). Aceptado 2014. En prensa.
- Cámara, M., Matallana, M. C., Sánchez-Mata, M. C., Lillo, R. y Labra, E. (2003a). Lycopene and hydrometilfurfural (HMF) evaluation in tomato products. *Acta Horticulturae*, 613, 365-371.
- Cámara, M., Sánchez-Mata, M. C., Torija, M. E. (2003b). *Frutas y verduras fuente de salud*. Monografía nº 8. Colección Nutrición y Salud. Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad y Consumo Comunidad de Madrid.
- Cámara, M., Torrecilla, J. S., Cáceres, J. O., Sánchez-Mata, M. C. y Fernández-Ruiz, V. (2010). Neural network analysis of spectroscopic data of lycopene and  $\beta$  carotene content in food samples compared to HPLC-UV-Vis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 72-75.
- Cámara, M., Sánchez-Mata, M. C., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. R., Manzoor, S. y Cáceres, J. O. (2013a). Lycopene: A Review of Chemical and Biological Activity Related to Beneficial Health Effects. In: Atta-ur-Rahman. En *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V.

- Cámara, M., Fernández Ruiz, V., Fernández Redondo, D., Torrecilla, J. S. y Sánchez-Mata, M. C. (2013b). Prediction of Lycopene Stability in Tomato Products by Radial Basis Network Analysis. *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Sciences. Cámara, M., Guitong L. y Colvine, S. (Eds.) Leuven (Bélgica), 971, 149 - 154 (2013).
- Candelas-Cadillo, M. G., Alanís-Guzmán, M. G. J., Bautista-Justo, M., Del Río-Olague, F. y García-Díaz, C. (2005). Contenido de licopeno en jugo de tomate secado por aspersión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 4, 299-307.
- Caponio, F., Bilancia, M. T., Pasqualone, A., Sikorska, E. y Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology*, 221 (1-2), 92-98.
- Caponio, F., Paradiso, V. M., Bilancia, M. T., Summo, C., Pasqualone, A. y Gomes, T. (2013). Diacylglycerol isomers in extra virgin olive oil: Effect of different storage conditions. *Food Chemistry*, 140 (4), 772-776.
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distante, A. y De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of the Mediterranean Diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 622-629.
- Carrasco Pancorbo, A., Cruces-Blanco, C., Segura Carretero, A. y Fernández Gutiérrez, A. (2004). Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (22), 6687-6693.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T. y Fernández-Gutiérrez, A. (2005a). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, 28 (9-10), 837-858.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D. y Fernández-Gutiérrez, A. (2005b). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (23), 8918-8925.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G. y Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4771-4780.
- Castañer, O., Covas, M. I., Khymentets, O., Nyyssonen, K., Konstantinidou, V., Zunft, H. F., de la Torre, R., Muñoz-Aguayo, D., Vila, J. y Fitó, M. (2012). Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products *in vivo* in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95 (5), 1238-1244.
- Cervera Ral, P. (2008). Fomento del consumo de frutas y hortalizas: vehículo de promoción de la salud y prevención de trastornos y patologías prevalentes en la sociedad actual. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 15 (2), 39-48.

- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11 (2-3), 153-177.
- Christian, M. S., Sharper, V. A., Hoberman, A. M., Seng, J. E., Fu, L., Covell, D., Diener, R.M., Bitler, C. M. y Crea, R. (2004). The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 27 (4), 309-330.
- CIISCAM (2009). Centro Interuniversitario Internazionale di Studi sulle Culture Alimentari Mediterranee. The Mediterranean Diet: a model of sustainable diet. 3rd CIISCAM International Conference. Parma. Disponible en: [www.ciiscam.org/203/28/products/3rd\\_ciiscam\\_international\\_conference.html](http://www.ciiscam.org/203/28/products/3rd_ciiscam_international_conference.html). [Último acceso: 02/10/14].
- Clark, L. C., Combs, G. F. y Turnbull, B. W. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *The Journal of the American Medical Association*, 276, 1957-1963.
- Clinton, S. K. (1998). Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews*, 56 (2), 35-51.
- COI (2013). Consejo Oleícola Internacional. International Olive Council. Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil COI/T.20/Doc. No15/Rev. 6.
- COI (2014). Consejo Oleícola Internacional. Disponible en: <http://www.internationaloliveoil.org>. [Último acceso: 20/11/14].
- Cossignani, L., Luneia, R., Damiani, P., Simonetti, M. S., Riccieri, R. y Tiscornia, E. (2007). Analysis of isomeric diacylglycerolic classes to evaluate the quality of olive oil in relation to storage conditions. *European Food Research and Technology*, 224 (3), 379-383.
- Covas, M. I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M.A., Joglar, J., Weinbrenner, T., Lamuela-Raventos, R. M. de la Torre, R. (2006a). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40 (4), 608-616.
- Covas, M. I., Fitó, M., Lamuela-Raventos, R. M., Sebastia, N., De la Torre-Boronat, C. y Marrugat, J. (1999). Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, 20 (3-4), 49-54.
- Covas, M. I., Nyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J. F., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Baumler, H., Nascetti, S., Salonen, J. T., Fitó, M., Virtanen, J. y Marrugat, J. (2006b). The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors: A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*, 145 (5), 333-341.
- Creus, E. G. (2003). El aceite de oliva como alimento clave de la Dieta Mediterránea. *OFFARM*, 22 (11), 88-94.

- Dabbou, S., Chehab, H., Faten, B., Dabbou, S., Esposto, S., Selvaggini, R., Taticchi, A., Servili, M., Montedoro, G.F. y Hammami, M. (2010). Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agricultural Water Management*, 97 (5), 763-768.
- De la Puerta, R., Gutiérrez, V. R. y Hoult, J. R. S. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, 57 (4), 445-449.
- De la Puerta, R., Martínez-Domínguez, E. y Ruiz-Gutiérrez, V. (2000). Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 55 (9/10), 814-819.
- De la Torre-Carbot, K., Chávez-Servín, J. L., Jaúregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Nurmi, T., Poulsen, H. E., Gaddi, A.V., Kaikkonen, J., Zunft, H. F., Kieseewetter, H., Fito, M., Covas, M. I. y López-Sabater, M. C. (2010). Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *The Journal of Nutrition*, 140 (3), 501-508.
- Deiana, M., Aruoma, O. I., Bianchi, M. D. L. P., Spencer, J. P., Kaur, H., Halliwell, B., Aeschbach, R., Banni, S., Dessi, M. A. y Corongiu, F. P. (1999). Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (5), 762-769.
- Del Caro, A., Vacca, V., Poiana, M., Fenu, P. y Piga, A. (2006). Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. *Food Chemistry*, 98 (2), 311-316.
- Del Valle-Ávila, M. (2004). Estudio analítico del residuo sólido obtenido en la producción de derivados de tomate. Tesis Doctoral UCM.
- Demuth, H., Beale, M. y Hagan, M. (2007). *Neural Network Toolbox for Use with MATLAB User's Guide. Version 5. Ninth printing Revised for Version 5.1.*
- Di Tomo, P., Canali, R., Ciavardelli, D., Di Silvestre, S., De Marco, A., Giardinelli, A., Pipino, C., Di Pietro, N., Virgili F. y Pandolfi A. (2012).  $\beta$ -Carotene and lycopene affect endothelial response to TNF- $\alpha$  reducing nitro-oxidative stress and interaction with monocytes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56 (2), 217-227.
- During, A. y Harrison, E. H. (2004). Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430 (1), 77-88.
- Edgecombe, S. C., Stretch, G. L. y Hayball, P. J. (2000). Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *The Journal of Nutrition*, 130 (12), 2996-3002.
- Elgass, S., Cooper, A., y Chopra, M. (2012). Lycopene inhibits angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells and rat aortic rings. *British Journal of Nutrition*, 108(03), 431-439.



- Elgass, S., Cooper, A., y Chopra, M. (2014). Lycopene treatment of prostate cancer cell lines inhibits adhesion and migration properties of the cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11 (9), 948.
- Erdman, J. W. (2005). How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene? *The Journal of Nutrition*, 135 (8), 2046S-2047S.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F. y Giugliano, D. (2004). Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *The Journal of the American Medical Association*, 292 (12), 1440-1446.
- Estruch, R., Martínez-González, M. A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M. I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M. C., Vinyoles, E., Aros, F., Conde, M., Lahoz, C., Lapetra, J., Saez, G. y Ros, E. (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145 (1), 1-11.
- ESYRCE (2014). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/00ESPA%C3%91A\\_tcm7-352546.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/00ESPA%C3%91A_tcm7-352546.pdf). [Último acceso: 15/12/14].
- EUROSTAT (2014). Disponible en: <http://ec.europa.eu/eurostat>. [Último acceso: 1/12/14].
- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F. y Morozzi, G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*, 11 (4), 351-358.
- FAECA (2014). Federación Andaluza de Empresas Cooperativas Agrarias. Disponible en: <http://www.faeca.es/> 2014. [Último acceso: 10/12/14].
- FAO (2014). Food and Agricultural Organization of the United Nations. Agronoticias América Latina y el Caribe. Disponible en: <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/en/c/213583/>. [Último acceso: 13/10/14].
- FAOSTAT (2014). Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Database. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>. [Último acceso: 20/11/14].
- Féart, C., Samieri, C. y Barberger-Gateau, P. (2010). Mediterranean Diet and cognitive function in older adults. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13 (1), 14.
- FECYT (2005) Alimentos Funcionales. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid. Disponible en: [http://infoalimenta.com/uploads/\\_publicaciones/id58/58\\_Alimentos-funcionales.pdf](http://infoalimenta.com/uploads/_publicaciones/id58/58_Alimentos-funcionales.pdf). [Último acceso: 27/06/14].
- FEPEX (2014) Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas. Disponible en [www.fepe.es](http://www.fepe.es). [Último acceso: 07/11/14].

- Fernández, A. G., Fernández-Diez, M. J. y Adams, M. R. (1997). Table olives: production and processing. Springer.
- Fernández, C., Pitre, A., Llobregat, M. J. y Rondón, Y. (2007). Evaluación del contenido de licopeno en pastas de tomate comerciales. *Información Tecnológica*, 18 (3), 31-38.
- Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. y Quintela, J. C. (2007). Ingredientes bioactivos de tomate: el licopeno. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 3, 166.
- Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Fernández-Redondo, D., Torrecilla, J. S. y Sánchez-Mata, M. C. (2014) Food control: Application of RBN in gazpacho and related tomato products. *Acta Horticulturae*, International Society for Horticultural Sciences. Cámara, M., Battilani, A. y Colvine, S. (Eds.) Leuven (Bélgica). Aceptado 2014. En prensa.
- Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Torija, M. E., Balaguer, G., Roselló, S. y Nuez, F. (2009). Enhancing human health: tomato fruits as a source of lycopene in the diet. *Schironia*. 8, 5-10.
- Fernández-Ruiz, V., Torrecilla, J. S., Cámara, M., Sánchez Mata, M. C. y Shoemaker, C. (2010). Radial basis network analysis of color parameters to estimate lycopene content on tomato fruits. *Talanta*, 83 (1), 9-13.
- Fielding, J. M., Rowley, K. G., Cooper, P. y O'Dea, K. (2005). Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14 (2).
- Firestone, D. (2005) United States Food and Drug Administration Washington, DC. Olive oil. En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- Fish, W. W., Perkins-Veazie, P. y Collins, J. K. (2002). A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (3), 309-317.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., Sánchez, J., De Miguel, C. y Martín-Vertedor, D. (2013). Total phenolic compounds and tocopherols profiles of seven olive oil varieties grown in the south-west of Spain. *Journal of Oleo Science*, 63 (2), 115-125.
- Frankel, E. N. (2010). Chemistry of extra virgin olive oil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10), 5991-6006.
- Fundación Dieta Mediterránea (2013). Disponible en: [dietamediterranea.com/piramide-dietamediterranea/](http://dietamediterranea.com/piramide-dietamediterranea/). [Último acceso: 20/12/13].
- Furneri, P. M., Piperno, A., Sajia, A. y Bisignano, G. (2004). Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (12), 4892-4894.
- García, A., Brenes, M., García, P., Romero, C. y Garrido, A. (2003). Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology*, 216 (6), 520-525.

- García-Alonso, F. J., Bravo, S., Casas, J., Pérez-Conesa, D., Jacob, K. y Periago, M. J. (2009). Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6815-6822.
- Gerber, M., Hill, M. J., Giacosa, A. y Caygill, C. P. J. (1994). Olive oil and cancer. *Epidemiology of Diet and Cancer*, 263-275.
- German Society for Fat Science (2005). Determination of Isomeric di-Acylglycerols in Olive Oil. GC method Draft: 4.10.2005.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H. y Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.). A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (3), 3291-3340.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C. y López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78 (2), 207-211.
- Giovannucci, E. (2002). A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene and prostate cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 94, 391-398.
- Giovannuci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of National Cancer Institute*, 91, 317-331.
- Giuliano, A. R., Neilson, E. M., Yap, H. H., Baier, M. y Canfield, L. M. (1994). Quantitation of and inter/intra-individual variability in major carotenoids of mature human milk. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5 (11), 551-556.
- Gómez-Alonso, S., Fregapane, G., Salvador, M. D. y Gordon, M. H. (2003). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3), 667-672.
- Gómez-Alonso, S., Salvador, M. D. y Fregapane, G. (2002). Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (23), 6812-6817.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G. y Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41 (4), 433-440.
- Goodwin, T. W. (1971). Biosynthesis in Carotenoids (Isler, O ed.). Birkhauser Verlag Basel UND, Stuttgart, 7, 606-607.
- Goodwin, T.W. (1971). Biosynthesis. In: Carotenoids, Isler O., Basilea, Suiza.
- Goralczyk, R. y Siler, U. (2004). DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland. Phytochemicals in Health and Disease, 256-262.

- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Katrich, E., Lojek, A., Cíz, M., Gligelmo-Miguel, N., Haruenkit, R., Park, Y. S., Jung, S. T. y Trakhtenberg, S. (2003). Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14 (3), 154-159.
- Gramatica, P. (2007). Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR Combinatorial Science*, 26, 694-701.
- Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure Activity Relationship [(Q)SAR] Models (2007), No. 69, OECD, Series on Testing and Assessment, Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Gupta, R., Balasubramaniam, V. M., Schwartz, S. J. y Francis, D. M. (2010). Storage stability of lycopene in tomato juice subjected to combined pressure-heat treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14), 8305-8313.
- Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58 (11), 966-968.
- Gutiérrez, F., Arnaud, T. y Garrido, A. (2001). Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (15), 1463-1470.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, A. y Albi, M. A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1), 121-127.
- Gutiérrez, F., Villafranca, M. J. y Castellano, J. M. (2002). Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (7), 669-676.
- Halliwel, B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health. *Cardiovascular Research*, 73 (2), 341-347.
- Halliwel, B. (1987). Oxidants and human disease: Some new concepts. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1, 358.
- Hashim, Y. Z., Eng, M., Gill, C. I., McGlynn, H. y Rowland, I. R. (2005). Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutrition Reviews*, 63 (11), 374-386.
- Hashimoto, T., Ibi, M., Matsuno, K., Nakashima, S., Tanigawa, T., Yoshikawa, T. y Yabe-Nishimura, C. (2004). An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (5), 555-564.
- Hercberg, S.; Czernichow, S. y Galan, P. (2006) Antioxidant vitamins and minerals in prevention of cancers: lessons from the SUVIMAX study. *British Journal of Nutrition*, 96 (Supl. 1): S28-30.

- Hung, C. F., Huang, T. F., Chen, B. H., Shieh, J. M., Wu, P. H. y Wu, W. B. (2008). Lycopene inhibits TNF- $\alpha$ -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *European Journal of Pharmacology*, 586 (1), 275-282.
- ICEX (2012). Información Sectorial de Alimentos-Aceite de Oliva 2012. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/informacion%20sectorial%20de%20alimentos-aceite%20de%20oliva%202012%20icex.pdf>. [Último acceso: 30/08/14].
- ILSI Europe (Internacional Life Science Institute). (1999). FOFOSE, Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus Documents. *Journal of Nutrition*, 81, 15-27S.
- Infante-Amate, J. (2012). Cuántos siglos de aceituna. El carácter de la expansión olivarera en el sur de España (1750-1900). *Historia Agraria*, 58, 39-72.
- Inglese, P., Famiani, F., Galvano, F., Servili, M., Esposto, S. y Urbani, S. (2011). 3 Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition. *Horticultural Reviews*, 38, 83.
- Issa, C., Darmon, N., Salameh, P., Maillot, M., Batal, M. y Lairon, D. (2011). A Mediterranean Diet pattern with low consumption of liquid sweets and refined cereals is negatively associated with adiposity in adults from rural Lebanon. *International Journal of Obesity*, 35 (2), 251-258.
- Ito, Y., Wakai, K., Suzuki, K., Ozasa, K., Watanabe, Y., Seki, N., Ando, M., Nishino, Y., Kondo, T., Ohno, Y. y Tamakoshi, A. (2005). Lung cancer mortality and serum levels of carotenoids, retinol, tocopherols, and folic acid in men and women: a case-control study nested in the JACC Study. *Journal of Epidemiology*, 15 (Supplement\_II), S140-S149.
- Jacob, K., García-Alonso, F. J., Ros, G. y Periago, M. J. (2010). Stability of carotenoids, phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant capacity of tomatoes during thermal processing. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, 60 (2), 192-198.
- Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2 (4), 379-392.
- Johnson E. J. (1998). Human studies on bioavailability and plasma response of lycopene. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 218, 115-120. 13.
- Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J. y Lee, K. W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*, 130, 310-324.
- Kastorini, C. M., Milionis, H. J., Esposito, K., Giugliano, D., Goudevenos, J. A. y Panagiotakos, D. B. (2011). The effect of Mediterranean Diet on metabolic syndrome and its components a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American College of Cardiology*, 57 (11), 1299-1313.
- Keys, A., Mienotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., Keys, M. H. Kromhout, D., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Seccareccia, F. y Toshima, H. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology*, 124 (6), 903-915.

- Kiritsakis, A. K. (1998). Olive oil from the tree to the table (2nd ed.). Trumbull, CT: Food and Nutrition Press.
- Kohlmeier, L., Kark, J. D., Gómez-Gracia, E., Martín B. C., Steck, S. E., Kardinaal A. F., Ringstad, J., Thamm, M., Masaev, V., Riemersma, R., Martín-Moreno, J. M., Huttunen, J. K., Kok, F. J. (1997). Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *American Journal of Epidemiology*, 15; 146 (8), 618-26.
- Kong, K. W., Khoo, H. E., Prasad, K. N., Ismail, A., Tan, C. P. y Rajab, N. F. (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15, 959-987.
- Kountouri, A. M., Mylona, A., Kaliora, A. C. y Andrikopoulos, N. K. (2007). Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine*, 14 (10), 659-667.
- La Vecchia, C. (2004). Mediterranean Diet and cancer. *Public Health Nutrition*, 7(07), 965-968.
- Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruits: assesing the mechanisms of action in human experiments studies. *American Journal of Clininical Nutrition*, 70, 475S-90S.
- Laso, N., Mos, S., Lafuente, M. J., Llobet, J. M., Molina, R., Ballesta, A., Kensler, T.W. y Lafuente, A. (2002). Capacidad de inducción metabólica de las verduras más consumidas habitualmente. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 9 (4).
- Lavelli, V. y Torresani, M. C. (2011). Modelling the stability of lycopene-rich by-products of tomato processing. *Food Chemistry*, 125, 529–535.
- Lee, A., Thurnham, D. I. y Chopra, M. (2000). Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases the antioxidant activity of plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 29 (10), 1051-1055.
- Lee, M. T. y Chen, B. H. (2001). Separation of lycopene and its *cis* isomers by liquid chromatography. *Chromatographia*, 54, 613–617.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J.L., Asther, M. y Labat, M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75 (4), 501-507.
- Levy, J., Bosin, E. y Feldman, B. (1995). Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutrition and Cancer*, 24 (3), 257-266.
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W.S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel, L., Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M. y Wylie-Rosett, J. (2006). Diet and lifestyle recommendations revision 2006. A scientific statement from the American Heart Association nutrition committee. *Circulation*, 114 (1), 82-96.

- López-Miranda J., Pérez-Jiménez F., Ros E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M. I... y Yiannakouris, N. (2010). Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20 (4), 284-294.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Menéndez, J. A., Oliveras-Ferraro, C., Cerretani, L. y Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Prediction of extra virgin olive oil varieties through their phenolic profile. Potential cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (18), 9942-9955.
- MAGRAMA (2014). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente disponible en: [www.magrama.gob.es/es/](http://www.magrama.gob.es/es/) [Último acceso: 12/12/14].
- MAGRAMA. (2013). Análisis de consumo alimentario. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [www.mapa.es](http://www.mapa.es). <http://www.magrama.gob.es/>. [Último acceso: 16/09/14].
- Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Goñi Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D. and Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53, S194-S218.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. y Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1), 230S-242S.
- Mangas-Cruz, M. A., Fernández-Moyano, A., Albi, T., Guinda, A., Relimpio, F., Lanzon, A., Pereira, J. L., Serrera, J. L., Montilla, C., Astorga, R. y García-Luna, P. P. (2001). Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clinical Nutrition*, 20 (3), 211-215.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Molledo, O., Leone, A. y Zappia, V. (1997). The protective effect of the olive oil polyphenol (3, 4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 127 (2), 286-292.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G. y Zappia, V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10 (3), 159-165.
- Marrugat, J., Covas, M. I., Fitó, M., Schröder, H., Miró-Casas, E., Gimeno, E., Lopez-Sabater, M. C., de la Torre, R. y Farré, M. (2004). Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. *European Journal of Nutrition*, 43 (3), 140-147.

- Martínez-González, M. A., Bes-Rastrollo, M., Serra-Majem, L., Lairon, D., Estruch, R. y Trichopoulou, A. (2009). Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutrition Reviews*, 67 (S1), S111-S116.
- Martínez-González, M. A., De la Fuente-Arrillaga, C., Nuñez-Cordoba, J. M., Basterra-Gortari, F. J., Beunza, J. J., Vázquez, Z., Benito, S., Tortosa, A. y Bes-Rastrollo, M. (2008). Adherence to Mediterranean Diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 336 (7657), 1348-1351.
- Martínez-González, M. A., Fernández-Jarne, E., Serrano-Martínez, M., Marti, A., Martinez, J. A. y Martín-Moreno, J. M. (2002). Mediterranean Diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *European Journal of Nutrition*, 41 (4), 153-160.
- Martín-Pozuelo, G., Navarro-González, I., González-Barrio, R., Santaella, M., García-Alonso, J., Hidalgo, N., Gómez-Gallego, C. y Periago, M. J. (2014). The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *European Journal of Nutrition*, 1-12.
- Massaro, M., Basta, G., Lazzerini, G., Carluccio, M.A., Bosetti, F., Solaini, G., Visioli, F., Paolicchi, A. y De Caterina, R. (2002). Quenching of intracellular ROS generation as a mechanism for oleate-induced reduction of endothelial activation in early atherogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, 88, 335-344.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F. y Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5), 2185-2192.
- Mayeaux, M., Xu, Z., King, J. M. y Prinyawiwatkul, W. (2006). Effects of cooking conditions on the lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, 71 (8), C461-C464.
- Mayor Oxilia, R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 5 (2), 23-29.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. y Heredia, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *ALAN*, 54 (2).
- Méndez, A. I. y Falqué, E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*, 18 (5), 521-529.
- Méndez, M. A., Popkin, B. M., Jakszyn, P., Berenguer, A., Tormo, M. J., Sánchez, M. J., Quiros J. R., Pera, G., Navarro, C., Martínez, C., Larranaga, N., Dorronsoro, M., Chirlaque, M. D., Barricarte, A., Ardanaz, E., Amiano, P., Agudo, A. y González, C. A. (2006). Adherence to a Mediterranean Diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity. *The Journal of Nutrition*, 136 (11), 2934-2938.



- Mendis, S., Puska, P. y Norrving, B. (2011). Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44701>. [Último acceso: 29/08/14].
- Mendoza, A., Izquierdo, J., J. R. y Gutiérrez Rosales F. (1997). Aceite de Olive Virgen Análisis Sensorial. Editorial Agrícola Española, S. A. Artes Gráficas COIMOFF, S. A. Madrid, Spain.
- Menéndez, J. A., Vázquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A. y Segura-Carretero, A. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BioMed Central Cancer*, 7 (1), 80.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. y Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (5), 1146-1155.
- MERCASA. (2013). Disponible en: [http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion\\_2013/pdfs/pag\\_095-160\\_frutas-hortalizas.pdf](http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2013/pdfs/pag_095-160_frutas-hortalizas.pdf). [Último acceso: 02/11/14].
- Meskin, M. S., Bidlack, W. R., Davies, A. J. y Omaye, S. T. (2002). *Phytochemicals in Nutrition and Health*. CRC Press.
- Mills, L. M., Wilson, H. y Thies, F. (2012). Lycopene inhibits lymphocyte proliferation through mechanisms dependent on early cell activation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56 (7), 1034-1042.
- Ministero della Salute Gruppo di Lavoro (D.M. 01/09/2003). Elaborazione del tipo di dieta verso cui indirizzare il cittadino consigliando le opportune variazioni. Roma, 2004.
- Miro-Casas, E., Covas, M. I., Farre, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., Roset, P. y de la Torre, R. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*, 49 (6), 945-952.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. y Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (9), 1571-1576.
- Morelló, J.R., Motilva, M. J., Tovar, M. J. y Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85 (3), 357-364.
- Moreno, J. J. (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radical Biology and Medicine*, 35 (9), 1073-1081.
- Moreno-Luna, R., Muñoz-Hernandez, R., Miranda, M. L., Costa, A. F., Jiménez-Jiménez, L., Vallejo-Vaz, A. J., Muriana, F. J., Villar, J. y Stiefel, P. (2012). Olive oil polyphenols decrease blood

- pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *American Journal of Hypertension*, 25 (12), 1299-1304.
- Motilva, M. J., Jaria, I., Bellart, I. y Romero, M. P. (1998). Estudio de la calidad del aceite de oliva virgen de la Denominación de Origen «Les Garrigues» (Lleida) durante la campaña 1995/96. *Grasas y Aceites*, 49 (5-6), 425-433.
- Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P., Alegre, S. y Girona, J. (2000). Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (14), 2037-2043.
- Nahum, A., Hirsch, K., Danilenko, M., Watts, C. K., Prall, O. W., Levy, J. y Sharoni, Y. (2001). Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27 (Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene*, 20 (26), 3428-3436.
- Narisawa, T., Fukaura, Y., Hasebe, M., Nomura, S., Oshima, S., Sakamoto, H., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Takayasu, J. y Nishino, H. (1998). Prevention of N-Methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats by lycopene and tomato juice rich in lycopene. *Cancer Science*, 89 (10), 1003-1008.
- Nguyen, M. L. y Schwartz, S. J. (1999). Lycopene: Chemical and Biological Properties. *Food Technology*, 53 (2), 38– 44.
- O'Dowd, Y., Driss, F., Dang, P. M. C., Elbim, C., Gougerot-Pocidalo, M. A., Pasquier, C. y El-Benna, J. (2004). Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, 68 (10), 2003-2008.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny R. y Martín-Belloso, O. (2008). Changes of health related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 272-299.
- Oliveras-López, M. J., Molina, J. J. M., Mir, M. V., Rey, E. F., Martín, F. y de la Serrana, H. L. G. (2013). Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 57 (2), 234-242.
- Olives Barba, A. I., Cámara Hurtado, M., Sánchez Mata, M. C., Fernández Ruiz, V. y López Sáenz de Tejada M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and beta-carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95, 328-336.
- Olmedilla, B., Granado, F. y Herrero, C. (2001) Dieta Mediterránea y suplementación con micronutrientes: pros y contras. *Revista Chilena de Nutrición*, 28 (2), 368-380.
- OMS, (1990) World Health Organization. Study Group Nutrition and the prevention of chronic diseases, R S 797, 30-39.

- Ordóñez, A. L., Balanza, M. E., Martín, F. y Flores, C. A. (2009). Estabilidad del carotenoide licopeno en tomates en conserva. *Información Tecnológica*. 20 (4), 31-37.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B. y Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, 1 (2), 107-112.
- Palozza, P., Parrone, N., Simone, R. E. y Catalano, A. (2010). Lycopene in atherosclerosis prevention: an integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504 (1), 26-33.
- Panagiotakos, D. B., Chrysohoou, C., Pitsavos, C. y Stefanadis, C. (2006). Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean Diet: the ATTICA study. *Nutrition*, 22 (5), 449-456.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E. y Skinner, M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (3), 295-298.
- Peralta, I. E. y Spooner, D. M. (2000). Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana*, 28-45.
- Pérez-Camino, M. D. C., Moreda, W. y Cert, A. (2001). Effects of olive fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerol content of virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 699-704.
- Pérez-Rodrigo, C. y Aranceta-Bartrina, J. (2011). La Dieta Mediterránea en el marco de la nutrición comunitaria: luces y sombras. En *¿Es posible la Dieta Mediterránea en el siglo XXI?* Alonso- Aperte, E., Varela Moreiras, G., Silvestre-Castelló, D. Ed. IMC.
- Periago, M. J., Martínez-Valverde, I., Ros, G., Martínez, C. y López, G. (2001). Propiedades químicas, biológicas y valor nutritivo del licopeno. *Anales de Veterinaria (Murcia)* 17, 51-66.
- Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F. y Galli, C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, 78 (2), 151-160.
- Pirisi, F. M., Angioni, A., Cabras, P., Garau, V. L., di Teulada, M. T. S., dos Santos, M. K. y Bandino, G. (1997). Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *Journal of Chromatography A*, 768 (2), 207-213.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M. y Muggelli, M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (4), 1191-1196.
- Porrini, M., Riso, P. y Testolin, G. (1998). Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *The British Journal of Nutrition*. 80, 353-361.

- Puel, C., Quintin, A., Agalias, A., Mathey, J., Obled, C., Mazur, A., Davicco, M. J., Lebcque, P., Skaltsounis, A. L. y Coxam, V. (2004). Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *British Journal of Nutrition*, 92 (01), 119-127.
- Quiles, J. L., Farquharson, A. J., Simpson, D. K., Grant, I. y Wahle, K. W. (2002). Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *British Journal of Nutrition*, 88 (03), 225-234.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27 (1), 76-89.
- Ragione, F. D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V. D., Pontoni, G., Racioppi, L., Manna, C., Galletti, P. y Zappia, V. (2000). Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278 (3), 733-739.
- Rao, A. V. (2006) *Tomatoes, Lycopene & Human Health: Preventing Chronic Diseases*, Caledonian Science Press.
- Rao, A. V. y Agarwal, S. (1998). Effect of diet and smoking on serum lycopene and lipid peroxidation. *Nutrition Research*, 18 (4), 713-721.
- Ré, R., Bramley, P. M. y Rice-Evans. (2002). Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean tomato variety. *Free Radical Research*, 36 (7), 803 – 810.
- Reich, P., Shwachman, H. y Craig, J. M. (1960). Lycopopenia: a variant of carotenemia. *New England Journal of Medicine*, 262 (6), 263-269.
- Rice-Evans, C.A. y Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-795.
- Rizwan, M., Rodríguez-Blanco, I., Harbottle, A., Birch-Machin, M. A., Watson, R. E. B. y Rhodes, L. E. (2011). Tomato paste rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in humans *in vivo*: a randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*, 164(1), 154-162.
- Romaguera, D., Norat, T., Mouw, T., May, A. M., Bamia, C., Slimani, N., *et al.* (2009). Adherence to the Mediterranean Diet is associated with lower abdominal adiposity in European men and women. *The Journal of Nutrition*, 139 (9), 1728-1737.
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G. y Toschi, T. G. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (11), 3649-3654.

- Rubió, L., Valls, R. M., Macià, A., Pedret, A., Giral, M., Romero, M. P., de la Torre, R., Covas, M. I., Solà, R. y Motilva, M. J. (2012). Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chemistry*, 135 (4), 2922-2929.
- Rumawas, M. E., Meigs, J. B., Dwyer, J. T., McKeown, N. M. y Jacques, P. F. (2009). Mediterranean-style dietary pattern, reduced risk of metabolic syndrome traits, and incidence in the Framingham Offspring Cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (6), 1608-1614.
- Ryan, D. y Robards, K. (1998). Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123 (5), 31R-44R.
- Salami, M., Galli, C., De Angelis, L. y Visioli, F. (1995). Formation of F2 -isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: Inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacological Research*, 31 (5), 275-279.
- Salvador, M. D., Aranda, F., Gómez-Alonso, S. y Fregapane, G. (2001). Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*, 74 (3), 267-274.
- Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., Masala, G., Ceroti, M., Giovacchini, V., Pitozzi, V., Galli, C., Romani, A., Mulinacci, N., Bertolomeazzi, R., Dolara, P. y Palli, D. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 95 (04), 742-751.
- Sánchez Muniz, F. J. (2009). Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. En *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73 (3), 653-692.
- Sánchez-Villegas, A., Bes-Rastrollo, M., Martínez-González, M. A. y Serra-Majem, L. (2006). Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *International Journal of Obesity*, 30 (2), 350-358.
- Schieber, A. y Carle, R. (2005). Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 416-422.
- Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R. y Carluccio, M. A. (2012). Mediterranean Diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527 (2), 81-89.
- Seelert, K. (1992). Antioxidants in the prevention of atherosclerosis and coronary heart disease. *Internist Prax*, 32, 191-199.
- Selma, M. V., Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 6485-6501.

- Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R. y Montedoro, G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17 (2), 76-84.
- Shi, J. y Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Journal of Food Process Engineering*, 25 (6), 485-498.
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.
- Smith, A. B., Han, Q., Breslin, P. A. y Beauchamp, G. K. (2005). Synthesis and assignment of absolute configuration of (-)-Oleocanthal: a potent, naturally occurring non-steroidal anti-inflammatory and anti-oxidant agent derived from extra virgin olive oils. *Organic Letters*, 7 (22), 5075-5078.
- Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gensini, G. F. y Casini, A. (2008). Adherence to Mediterranean Diet and health status: meta-analysis. *British Medical Journal*, 337.
- Spyros, A., Philippidis, A. y Dais, P. (2004). Kinetics of diglyceride formation and isomerization in virgin olive oils by employing <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. Formulation of a quantitative measure to assess olive oil storage history. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2), 157-164.
- Stavric, B. (1994). Role of chemopreventers in human diet. *Clinical Biochemistry*, 27 (5), 319-332.
- Supreme Scientific Health Council, Ministry of Health and Welfare of Greece, Dietary guidelines for adults in Greece (1999). *Archives of Hellenic Medicine*, 16, 516-524.
- Suter, P.M. (2000) Effect of Vitamin E, Vitamin C, and  $\beta$ -Carotene on Stroke Risk. *Nutrition Reviews*, 58 (6), 184-187.
- Tomás-Barberán, F. A. y Andrés-Lacueva, C. (2012). Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (36), 8773-8775.
- Tomato News (2014) Italy: the main global exporter of tomato products nº 06/2014, 8-55.
- Torija Isasa, M. E., Matallana González, M. C., Sánchez Mata, M. C., Verde Méndez, C. M., Rodríguez Rodríguez, E. M. y Díaz Romero, C. (2007). En El gazpacho andaluz y su interés nutritivo. *Schironia*. 6, 20-27.
- Torrecilla, J. S., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Piera, G. y Cáceres, J. O. (2008). Solving the spectroscopy interference effects of  $\beta$ -carotene and lycopene by neural networks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6261-6266.
- Tortosa, A., Bes-Rastrollo, M., Sanchez-Villegas, A., Basterra-Gortari, F. J., Nuñez-Cordoba, J. M. y Martinez-Gonzalez, M. A. (2007). Mediterranean Diet inversely associated with the incidence of metabolic syndrome. The Sun prospective cohort. *Diabetes Care*, 30 (11), 2957-2959.

- Tovar, M. J., Motilva, M. J. y Romero, M. P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5502-5508.
- Trichopoulou, A., Bamia, C. y Trichopoulos, D. (2005) Mediterranean Diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Archives of Internal Medicine*, 25, 165 (8): 929-35.
- Trichopoulou, A., Bamia, C., y Trichopoulos, D. (2009). Anatomy of health effects of Mediterranean Diet: Greek EPIC prospective cohort study. *British Medical Journal*, 338.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. y Trichopoulos, D. (2003) Adherence to a Mediterranean Diet and survival in a Greek population. *The New England Journal of Medicine*, 348, 2599-2608.
- Trichopoulou, A., Katsouyanni, K. y Gnardellis, C. H. (1993). The traditional Greek diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47, S76.
- Trichopoulou, A., Kouris-Blazos, A. Wahlqvist, M.L., Gnardellis, C., Lagiou, P., Polychronopoulos, E., Vassilakou, T., Lipworth, L., Trichopoulos, D. (1995) Diet and overall survival in elderly people. *British Medical Journal*, 311, 1457-1460.
- Tsimidou, M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 10 (2), 99-116.
- Tsitsimpikou, C., Tsarouhas, K., Kioukia-Fougia, N., Skondra, C., Fragkiadaki, P., Papalexis, P., Stamatopoulos, P., Kaplanis, I., Wallace Hayes, A., Tsatsakis, A. y Rentoukas, E. (2014). Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syndrome: a suggestion to alleviate detrimental clinical factors. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 9-13.
- Tur Mari, J.A. (2013). Componentes no nutritivos de interés nutricional. En: Libro blanco de la nutrición en España. Varela Moreiras, G. Fundación Española de la Nutrición (FEN). 179-188.
- Tyrovolas, S. y Panagiotakos, D. B. (2010). The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: a systematic review. *Maturitas*, 65 (2), 122-130.
- UNESCO (2013). Intergovernmental Committee for the Safeguarding of the Intangible Cultural Heritage. Disponible en: <http://www.unesco.org/culture/ich/index.php?pg=00473>. [Último acceso: 01/12/14].
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Francis, D. M., Nagaraja, H. N., Clinton, S. K., Schwartz, S. J. (2007). Lycopene from heat-induced *cis*-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *The British Journal of Nutrition*. 98 (1), 140-146.

- Valli, E., Bendini, A., Cerretani, L., Fu, S., Segura-Carretero, A. y Cremonini, M. A. (2010). Effects of heating on virgin olive oils and their blends: focus on modifications of phenolic fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14), 8158-8166.
- Vallverdú-Queralt, A., Arranz, S., Casals-Ribes, I. y Lamuela-Raventós, R. M. (2012). Stability of the phenolic and carotenoid profile of gazpachos during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (8), 1981-1988.
- Van Breemen, R. B. y Pajkovic, N. (2008). Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Letters*, 269 (2), 339-351.
- Van Het Hof, K. H., Wiseman, S. A., Yang, C. S. y Tijburg, L. (1999). Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220 (4), 203-209.
- Verberne, L., Bach-Faig, A., Buckland, G. y Serra-Majem, L. (2010). Association between the Mediterranean Diet and cancer risk: a review of observational studies. *Nutrition and Cancer*, 62 (7), 860-870.
- Visioli, F. y Galli, C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 4292-4296.
- Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G. y Galli, C. (1995a). Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vitro* by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 117 (1), 25-32.
- Visioli, F., Bogani, P. y Galli, C. (2006). Healthful properties of olive oil minor components. *Olive Oil, Chemistry and Technology*. Boskou D (Ed.). AOCS Press, Champaign, IL, 173-190.
- Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli, G. y Galli, C. (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radical Research*, 34 (3), 301-305.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G. y Caruso, D. (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of Nutrition*, 133 (8), 2612-2615.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F. F. y Galli, C. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (8), 3397-3401.
- Visioli, F., Vincieri, F. F. y Galli, C. (1995b). 'Waste waters' from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51 (1), 32-34.
- Viszers, M. N., Zock, P. L. y Katan, M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58 (6), 955-965.
- Viszers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R. y Katan, M. B. (2002). Olive oil phenols are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 132 (3), 409-417.



- Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G. y Gaforio, J. J. (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3 (10), 839-857.
- Waterman, E. y Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review*, 12 (4), 331.
- Wei, M. Y. y Giovannucci, E. L. (2012). Lycopene, tomato products, and prostate cancer incidence: a review and reassessment in the PSA screening era. *Journal of Oncology*, 2012.
- Weinbrenner, T., Fito, M., de la Torre, R., Saez, G. T., Rijken, P., Tormos, C., Coolen, S., Albaladejo, M. F., Abanades, S., Schroder, H., Marrugat, J. y Covas, M. I. (2004). Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *The Journal of Nutrition*, 134 (9), 2314-2321.
- Wertz, K. (2009). Lycopene effects contributing to prostate health. *Nutrition and Cancer*, 61 (6), 775-783.
- Willcox, L. K., Catignani, G. L., Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1-18.
- Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E. y Trichopoulou, D. (1995). Mediterranean Diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61 (suppl), 1402S-1406S.
- Williamson, G. (1996). Protective effects of fruits and vegetables in the diet. *Nutrition and Food Science*, 1, 6-10.
- Williamson, G. y Clifford, M. N. (2010) Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104, S48-S66.
- Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y. y Yueming, J. (2005). Stability of lycopene during food processing and storage. *Journal of Medicinal Food*, 8 (4), 413-422.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. y Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21 (1), 381-406.
- Yúfera, E. P (1998). *Química de los Alimentos*. Madrid: editorial Síntesis.
- Yun, J. M., Jialal, I. y Devaraj, S. (2010). Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. *British Journal of Nutrition*, 103, 1771-1777.
- Zazpe, I., Bes-Rastrollo, M., Ruiz-Canela, M., Sánchez-Villegas, A., Serrano-Martínez, M. y Angel Martínez-González, M. (2011). A brief assessment of eating habits and weight gain in a Mediterranean cohort. *British Journal of Nutrition*, 105 (05), 765-775.

- Zechmeister, L. y Polgar, A. (1944). *Cis-trans* isomerization and *cis*-peak effect in the  $\alpha$ -carotene set and in some other stereoisomeric sets. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 137-144.
- Zechmeister, L., LeRosen, A. L., Schroeder, W. A., Polgar, A. y Pauling, L. (1943). Spectral characteristics and configuration of some stereoisomeric carotenoids including prolycopene and pro- $\gamma$ -carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 65 (10), 1940-1951.
- Zhang, X., Shu, X., Xiang, Y., Yang, G., Li, H., Gao, J., Cai, H., Gao, Y. y Zheng, W. (2011). Cruciferous vegetable consumption is associated with a reduced risk of total and cardiovascular disease mortality. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94, 240-246.
- Zhu, H., Clegg, M. S., Shoemaker, C. F. y Wang, S. C. (2013). Characterization of diacylglycerol isomers in edible oils using gas chromatography–ion trap electron ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1304, 194-202.



## 6.2. NORMATIVA

Consejo Regulador de la Denominación de Origen Estepa (2014). Disponible en: <http://www.doestepa.es/>. [Último acceso: 26/12/14].

Consejo Regulador de la Denominación de Origen Sierra de Segura (2014). Disponible en: <http://www.aceitedosierradesegura.com/es/>. [Último acceso: 26/12/14].

Consejo Regulador de la Denominación de Origen Les Garrigues (2014). Disponible en: <http://www.olidoplesgarrigues.com/>. [Último acceso: 26/12/14].

CODEX STAN 13-1981, Norma del CODEX para los tomates en conserva.

CODEX STAN 57-1981, Norma del CODEX para los concentrados de tomates elaborados.

Directiva 90/496/CEE del consejo, de 24 de septiembre de 1990, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios.

Directiva 2008/100/CE de la Comisión de 28 de octubre de 2008 por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones.

EFSA Journal (2009a). Scientific Opinion. Water-soluble tomato concentrate (WSTC I and II) and platelet aggregation Scientific substantiation of a health claim related to water-soluble tomato concentrate (WSTC I and II) and platelet aggregation pursuant to Article 13 (5) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal (2009) 1101, 1-15.

EFSA Journal (2009b). Scientific Opinion. Lycopene-whey complex (bioavailable lycopene) and risk of atherosclerotic plaques Scientific substantiation of a health claim related to Lycopene-whey complex (bioavailable lycopene) and reduction of the risk of atherosclerotic plaques pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal (2009) 1179, 1-10.

EFSA Journal (2011a). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lycopene and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1608, 1609, 1611, 1662, 1663, 1664, 1899, 1942, 2081, 2082, 2142, 2374), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 1259, 1607, 1665, 2143, 2262, 2373), contribution to normal cardiac function (ID 1610, 2372), and maintenance of normal vision (ID 1827) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011; 9 (4):2031.

EFSA (2011b) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive oil and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID

- 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011; 9 (4):2033.
- EFSA (2011c) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to oleic acid intended to replace saturated fatty acids (SFAs) in foods or diets and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 673, 728, 729, 1302, 4334) and maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 673, 4334) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011; 9 (4):2043.
- EFSA (2011d). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the replacement of mixtures of saturated fatty acids (SFAs) as present in foods or diets with mixtures of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and/or mixtures of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 621, 1190, 1203, 2906, 2910, 3065) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011; 9 (4):2069.
- Orden de 4 de noviembre de 1993 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen “Sierra de Segura” y su Consejo Regulador.
- Orden APA/3823/2004, de 4 de noviembre, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida «Estepa» y de su Consejo Regulador.
- Orden de 4 de abril de 2011, por la que se aprueba el Reglamento del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida «Estepa» y el Pliego de Condiciones de su producto.
- Real Decreto 858/1984 de 28 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de salsas de mesa. Última modificación: 29 de marzo de 2013.
- Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.
- Reglamento (CEE) no 2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento (CEE) n° 183/93 de la Comisión, de 29 de enero de 1993, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento (CE) No 1513/2001 del Consejo de 23 de julio de 2001 que modifica el Reglamento no 136/66/CEE y el Reglamento (CE) no 1638/98, en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva
- Reglamento (ce) no 1989/2003 (modificado por el 1348/2013) de la Comisión de 6 de noviembre de 2003 que modifica el Reglamento (CEE) no 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Reglamento (CE) 1535/2003 de la Comisión de 29 de agosto de 2003 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 2201/96 del Consejo en lo relativo al régimen de ayuda en el sector de los productos transformados a base de frutas y hortalizas.

Reglamento (CE) no 865/2004 del consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establece la organización común del mercado del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa y se modifica el Reglamento (CEE) no 827/68.

Reglamento (CE) No 1902/2004 de la Comisión de 29 de octubre de 2004 por el que se modifican los elementos del pliego de condiciones de la denominación que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1107/96 relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen (Les Garrigues).

Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

Reglamento (CE) No 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos.

Reglamento (CE) No 702/2007 de la Comisión de 21 de junio de 2007 por el que se modifica el Reglamento (CEE) no 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Reglamento (CE) no 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) no 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Reglamento (UE) No 116/2010 de la Comisión de 9 de febrero de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales.

Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión.

Reglamento (UE) 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

Reglamento (UE) no 1151/2012 del Parlamento Europeo y del consejo de 21 de noviembre de 2012 sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios.

Reglamento (UE) No 1018/2013 de la Comisión de 23 de octubre de 2013 que modifica el Reglamento (UE) no 432/2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

Reglamento de ejecución (UE) No 1348/2013 de la Comisión de 16 de diciembre de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) no 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.



## 7. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

---





## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

AUTORES: Montaña Cámara, Virginia Fernández-Ruiz, Delia Fernández Redondo, M. Cortes Sánchez-Mata, José S. Torrecilla.

TÍTULO: **Radial Basis Network Analysis to estimate lycopene degradation kinetics in tomato-based products.**

REVISTA: *Food Research International*. 49, 453-458 (2012).

AUTORES: Montaña Cámara, Virginia Fernández-Ruiz, Delia Fernández Redondo, José Santiago Torrecilla and M. Cortes Sánchez-Mata.

TÍTULO: **Prediction of Lycopene Stability in Tomato Products by Radial Basis Network Analysis.**

LIBRO: *Acta Horticulturae*, 971. International Society for Horticultural Sciences. Cámara, M; Guitong L. y Colvine, S. (Eds.) Leuven (Bélgica). pp. 149 - 154 (2013). ISBN: 978 90 6605 715 9.

AUTORES: Montaña Cámara, Virginia Fernández-Ruiz, Delia Fernández Redondo, M. Cortes Sánchez-Mata, Rosa M. Cámara and Carlos Gervás.

TÍTULO: **EFSA scientific requirements related to lycopene as antioxidant prevention of oxidative damage and cardiovascular health claims.**

LIBRO: *Acta Horticulturae*, International Society for Horticultural Sciences. Cámara, M; Battilani, A. y Colvine, S. (Eds.) Leuven (Bélgica). Aceptado 2014. En prensa.

AUTORES: Virginia Fernández-Ruiz, Montaña Cámara, Delia Fernández Redondo, José Santiago Torrecilla and M. Cortes Sánchez-Mata.

TÍTULO: **Food control: Application of RBN in gazpacho and related tomato products.**

LIBRO: *Acta Horticulturae*, International Society for Horticultural Sciences. Cámara, M; Battilani, A y Colvine, S. (Eds.) Leuven (Bélgica). Aceptado 2014. En prensa.





## 8. RESUMEN Y ABSTRACT

---



## 8.1. RESUMEN

### **Título de la Tesis:**

**“Derivados de tomate y aceite de oliva virgen extra. Calidad, compuestos bioactivos y alegaciones de salud”.**

### **Introducción:**

La Dieta Mediterránea es un buen ejemplo de dieta prudente y saludable, que además de ser sana, nutritiva y palatable, juega un papel esencial en la prevención de ciertas enfermedades crónicas, por lo que esta dieta única se ha convertido en el estándar de una vida más duradera y de buena salud. Dentro de la Dieta Mediterránea, el tomate es la hortaliza más representativa y el aceite de oliva la grasa más recomendable.

La calidad nutritiva de los productos vegetales depende de la cantidad y calidad de los macronutrientes y micronutrientes, además de proporcionar compuestos “bioactivos” (compuestos de origen vegetal con acción beneficiosa para la salud). En este sentido, la Unión Europea estableció el 19 de enero de 2006 el Reglamento europeo de alegaciones nutricionales y de salud en el etiquetado (Reglamento (CE) 1924/2006) en el que se prohíbe que un alimento pueda promocionarse como poseedor de propiedades terapéuticas o curativas.

### **Objetivos y plan de trabajo:**

Dada la importancia del tomate y del aceite de oliva en la dieta mediterránea por su composición nutricional, por los efectos beneficiosos sobre la salud humana y por su repercusión económica en nuestro país, esta Tesis Doctoral plantea los siguientes objetivos:

1. Evaluación del contenido de licopeno en derivados de tomate y de compuestos fenólicos y parámetros de calidad en el aceite de oliva virgen extra.

2. Revisión de la situación actual de las alegaciones de salud en el etiquetado conforme al Reglamento 1924/2006 relativas al tomate, licopeno, compuestos fenólicos y aceite de oliva.

Para dar cumplimiento a estos objetivos se han realizado dos estudios independientes: el primero de ellos referente al análisis del contenido de licopeno en distintos derivados de tomate y su estabilidad a lo largo del tiempo, y un segundo estudio en el que se determinaron los parámetros de calidad comercial y calidad diferenciada, además del análisis de diacilglicéridos y polifenoles en diferentes muestras de aceite de oliva virgen extra. Para ello, se han evaluado 15 muestras de distintos tipos de derivados de tomate (zumo de tomate, gazpacho, tomate entero pelado, tomate triturado, salsas de tomate y ketchup), y 6 muestras de aceites de oliva virgen extra (AOVE) procedentes de las variedades Arbequina, Hojiblanca y Picual, con denominación de origen protegida (DOP) (Les Garrigues, Estepa y Sierra de Segura) y sin esta certificación.

### **Resultados y conclusiones:**

Los resultados correspondientes a la caracterización del contenido de licopeno en **derivados de tomate** muestran que el contenido inicial de licopeno de las muestras analizadas en este trabajo es muy diferente en cada tipo de derivado de tomate, los niveles más bajos de este compuesto se observan en el gazpacho (5 mg/100 g) mientras que los valores más elevados corresponden a los ketchups, destacando K-H (24,60 mg/100 g).

En cuanto a la influencia del almacenamiento sobre el contenido de licopeno a lo largo de la vida útil de los distintos productos analizados, este compuesto se mantiene estable a lo largo del tiempo de vida útil del gazpacho mostrando unas pérdidas finales de 5,64%, mientras que el resto de productos presentan unas pérdidas del contenido inicial de licopeno superior al 40%. Se observa una notable disminución del contenido en licopeno a partir de los 6 meses de almacenamiento, destacando las elevadas pérdidas en el ketchup K-C (93%). Por tanto, es importante destacar el efecto negativo que ejerce el tiempo de almacenamiento sobre la composición de los derivados de tomate, resultando

fundamental la adecuada conservación de estos productos y el acortamiento del tiempo que éstos permanecen almacenados antes de su consumo, para garantizar la existencia de cantidades suficientes de licopeno y asegurar un efecto fisiológico beneficioso.

Considerando las recomendaciones planteadas por Rao (2006) de 7-8 mg de licopeno/día para poder ejercer un efecto antioxidante beneficioso para la salud, este requerimiento quedaría cubierto con la ingesta de:

- Una ración de **gazpacho** de 250 ml.
- Una ración (250 ml) de cualquiera de las muestras de **zumos** considerados.
- En el caso de los **kétschups** K-H y K-P, sería necesaria la ingesta de 3 raciones (10 ml) si se trata de una muestra recién comercializada, y de 7 raciones en el final de su vida útil. En el caso de la muestra K-C, los niveles de licopeno dejan de ser significativos (inferiores a 5 mg/100 g) a partir del 5º mes de almacenamiento.
- 100 ml de cualquiera de las **salsas** consideradas.
- 125-150 ml del **tomate entero pelado y tomate triturado**.

El modelo matemático no lineal **Radial Basis Network** (RBN) propuesto, ha demostrado ser un método útil y rápido para estimar los contenidos de licopeno en distintos derivados de tomate, mostrando un MPE menor de 3 y un R2 cercano a 1. Este modelo ofrece estimaciones más exactas en muestras homogéneas de derivados de tomate donde el tomate es el componente principal del producto, con lo que es especialmente recomendable en estos casos.

En cuanto a las declaraciones de propiedades en el **etiquetado**, únicamente están autorizadas las declaraciones de contenido en los productos que contienen licopeno. En relación con las declaraciones de propiedades saludables, sólo se ha autorizado una alegación relativa a los derivados de tomate correspondiente a un concentrado de tomate carente de licopeno cuyo efecto alegado es “reducción de la agregación plaquetaria”.



Referente al licopeno, ninguno de los estudios revisados cumple completamente con los requisitos de la EFSA para la sustentación de las alegaciones de propiedades antioxidantes del licopeno.

En relación al estudio del **aceite de oliva virgen extra** todas las muestras analizadas de aceite de oliva virgen extra en la presente Tesis Doctoral cumplen los requisitos exigidos por el Reglamento 2568/91 en cuanto al parámetro de grado/índice de acidez, índice de peróxidos, el índice K232,  $\Delta K$  y la mayoría de los índices K268.

Los aceites de oliva denominación de origen han mostrado mejores resultados que los que no poseen esta certificación. En cuanto al grado de acidez, el AOVE DOP de la variedad Picual ha presentado el menor grado de acidez entre todas las muestras, Hojiblanca DOP el menor índice de peróxidos, y el aceite DOP de la variedad Arbequina el que ha presentado el valor más bajo de los índices K232 y K268. Así, los aceites que poseen este sello de calidad han mostrado en este estudio una mejor calidad con respecto al resto de AOVE analizados.

Todas las muestras analizadas cumplen los requisitos exigidos por la legislación alemana en cuanto al parámetro de **diacilglicéridos**. Los aceites elaborados a partir de la variedad Arbequina (tanto DOP como sin DOP) muestran un porcentaje superior. Por el contrario, el AOVE de variedad Hojiblanca ha mostrado una relación inferior.

El AOVE con mayor cantidad de **polifenoles** totales analizados tanto por espectrofotometría como por HPLC (cuantificados mediante la suma de las concentraciones de tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína y ácido elenólico) ha sido Picual DOP, y el que menos, Arbequina DOP seguido de Arbequina. De esta manera, se observa que la variedad de aceituna tiene un papel fundamental en la cantidad total de polifenoles en el aceite, siendo elevada en la variedad Picual e inferior en Arbequina, mientras que Hojiblanca presenta valores intermedios.

En cuanto a las **alegaciones** de salud referidas al aceite de oliva, la EFSA ha autorizado las siguientes:

- Referidas a las grasas insaturadas (ácidos grasos monoinsaturados (como el ácido oleico) y poliinsaturados): “La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”.
- Relacionadas con los polifenoles del aceite de oliva “Los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al estrés oxidativo”.

Como conclusión general consideramos que es necesario resaltar la importancia del consumo de estos dos productos característicos de la dieta mediterránea, derivados de tomate y aceite de oliva virgen extra, tanto por su valor nutricional como por sus efectos positivos sobre la salud humana, debido a su contenido significativo en compuestos bioactivos, licopeno en los derivados de tomate y polifenoles en el aceite de oliva virgen extra.



## 8.2. ABSTRACT

### **Thesis title:**

**“Tomato products and extra virgin olive oil. Quality, bioactive compounds and health claims”.**

### **Introduction:**

The Mediterranean diet is a good example of healthy diet that besides being healthy and nutritious plays an essential role in the prevention of certain chronic diseases. This unique diet is considered an important part of good health and life style. Among the ingredients of the Mediterranean diet, tomato is the most representative vegetable and olive oil the most recommended fat.

The nutritional quality of plant products depends on the quantity and quality of macronutrients and micronutrients but also depends on their content on "bioactive compounds" (plant compounds with health beneficial action). In this respect, the European Union established on 19 January 2006 a European Regulation of nutritional and health claims in labeling (Regulation (EC) 1924/2006) which prohibits labeling a food with therapeutic or curative properties.

### **Objectives and work plan:**

Tomato and olive oil are essential products in the Mediterranean diet. This is due to their nutritional composition, beneficial effects on human health, and their impact on the Spanish economy. With these considerations, the present Doctoral Thesis has the following objectives:

1. The evaluation of lycopene content of tomato-based products and phenolic compounds and quality parameters of extra virgin olive oil.

2. The review of the current situation of the health claims according to the Regulation 1924/2006 related to tomato, lycopene, phenolic compounds and olive oil.

In order to achieve these objectives we have worked on two different studies: the first of them related to the content of lycopene and its stability where we have evaluated 15 samples of different tomato-based products (tomato juice, “gazpacho”, whole peeled tomato, crushed tomato, tomato sauce and ketchup). In the second study, we analyzed the phenolic compounds, the content of diacylglycerides and quality parameters of extra virgin olive oil in 6 samples of extra virgin olive oil (EVOO) obtained from different varieties of olives: Arbequina, Hojiblanca and Picual, with origin denomination (Les Garrigues, Estepa and Sierra de Segura) (DO) and without this certification.

### **Results and conclusions:**

The results obtained from the characterization of **lycopene content** on tomato-based products, showed that the Initial lycopene content was very different in each type of tomato-based products analyzed in this work, the lowest levels were observed in the gazpacho (5 mg/100 g) while the highest were detected in ketchup, highlighting the sample K-H (24.60 mg/100 g).

It is important to note the negative effect of storage time on tomato-based products lycopene content. This compound was more stable during gazpacho shelf life showing final losses of 5.64 % of initial content, while other products presented a reduction exceeding 40%. A remarkable decrease on lycopene content was found in the samples after 6 months storage, highlighting the large decrease on ketchup K-C lycopene content (93%). Therefore, an appropriate conservation of these products is essential in order to ensure sufficient quantities of lycopene are present to have a beneficial physiological effect.

Considering the recommendations made by Rao (2006), 7-8 mg lycopene/day are necessary to show beneficial antioxidant health effects, this requirement would be covered with the intake of:

- One serving of 250 ml **gazpacho**.
- One serving (250 ml) from any considered **juice**.
- In the case of **ketchup** K-P and K-H, 3 servings (10ml) would be necessary if it is recently produced and 7 portions at the end of its shelf life. For the sample K-C, lycopene levels become insignificant (below 5 mg /100 g) after the 5th month of storage.
- 100 ml of either considered **saucers**.
- 125-150 ml of whole peeled tomatoes and **crushed tomatoes**.

Nonlinear mathematical model, **Radial Basis Network** (RBN), has proved to be a useful and easy tool to estimate the lycopene content in different tomato-based products, showing a MPE lower than 3 and a  $R^2$  close to 1. This model is particularly relevant for homogeneous samples of tomato-based products, where the tomato is the main component.

As for the **health claims**, according with Regulation 1924/2006, only one claim has been authorized referring to tomato-based products corresponding to a tomato concentrate devoid of lycopene, which claimed effect is "reduction of platelet aggregation."

During the study of extra virgin olive oil, after having assessed all chemical parameters of merchantable and differentiated quality, we have determined that all extra virgin olive oil samples analyzed meet the requirements of Regulation 2568/91 concerning the parameters of free fatty acid, peroxide value, K232,  $\Delta K$  and most of K268 indexes.

Extra virgin olive oils with a denomination of origin analyzed yielded better results than those without this certification. Regarding the free fatty acid value, EVOO Picual DO had

the lowest value among the samples, EVOO Hojiblanca DO the lowest peroxide value, and Arbequina DO had the lowest K232 and K268 indexes. Thus, the oils with this quality certification were determined to have better quality compared to those EVOO without analyzed in this study.

All samples analyzed meet the requirements of the German regulation regarding **diacylglycerides**. Oils made from Arbequina (both DO and without DO) had a higher percentage, while EVOO Hojiblanca had a lower ratio.

Picual DO was the EVOO containing the highest content of total **polyphenols**, analyzed by spectrophotometry and HPLC (quantified by the sum of the concentrations of tyrosol, HT, elenolic acid and oleuropein), and the lowest values were found in EVOO Arbequina DO followed by Arbequina. Thus, it appears that the variety of olives has a key role in the total amount of polyphenols in olive oil, being high in the variety Picual and lower in Arbequina while Hojiblanca has intermediate values.

With regard to **health claims** relating to olive oil, EFSA has authorized the following:

- Related to olive oil polyphenols “Olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress”.
- Referred to unsaturated fats (monounsaturated fatty acids (as oleic acid) and polyunsaturated): "Replacing saturated fats in the diet with unsaturated fats contributes to the maintenance of normal blood cholesterol levels".

As a general conclusion, we consider that it is necessary to emphasize the importance of these essential products to the Mediterranean diet, tomato products and olive oil, both for their nutritional value and significant content of bioactive compounds, such as lycopene in tomato- based products and polyphenols in extra virgin olive oil.